

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Das Microenvironment der Akuten Myeloischen Leukämie
und dessen Beeinflussung der Immunantwort von
Natürlichen Killer Zellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jochen Vasold
aus Leoben

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Fiegl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Albert
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	18.07.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Epidemiologie, Klinik, Diagnose und Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML)	6
1.1.1 Therapiemöglichkeiten der AML	11
1.2 Immunologie	14
1.2.1 T-Zellen	19
1.2.2 NK-Zellen	20
1.2.3. Überblick Immuntherapie	22
1.2.4. Immuntherapie der AML	24
1.3 Microenvironment im Knochenmark	25
1.4 Fragestellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Allgemeine Materialien	29
2.2 Zellkultur	30
2.2.1 Kultivierung der Zellen	31
2.2.2 Trypanblau-Färbung und Zellzählung	34
2.3 Separation der PBMC und AML-Blasten	35
2.3.1. Selektion der einzelnen Lymphozytenfraktionen	36
2.4. Durchflusszytometrie (FACS)	39
2.4.1 FACS Färbungen	40
2.5 Lyse Assay	42

2.5.1 Durchführung.....	42
2.5.2 Auswertung	45
2.5.3. Auswertung und Gating-Strategie der Ko-Kultur Experimente mittels Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	46
2.6 Statistik.....	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Einfluss der Hypoxie auf NK- und T-Zellen	50
3.2 Hypoxie-konditionierte PBMC und deren Effekt auf die Lyse von Zelllinien	53
3.3 Hypoxie-konditionierte PBMC und deren Effekt auf die Lyse von primären AML- Blasten	55
3.4 Mesenchymale Stromazellen schützen AML-Blasten vor NK-Zell-vermittelter Lyse.....	57
3.5 Mechanismus der MSC-vermittelten Protektion von AML-Blasten	58
4. Diskussion	60
5. Zusammenfassung.....	70
6. Danksagung	73
7. Kongressbeiträge	74
8. Veröffentlichungen	74
9. Eidesstattliche Versicherung.....	75
10. Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum Albumin
CAR-T-Zellen	chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CR	Complete Response
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CXCL12	CXC Chemokin 12
CXCR4	CXC Chemokinrezeptor 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Esterase
FAB	French-American-British Klassifikation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein
GvH-D	Graft-versus-host-Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia Effekt
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
KM	Knochenmark
LSC	Leukämische Stammzelle
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPO	Myeloperoxidase
MSC	Mesenchymale Stromazellen
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT-Zellen	Natürliche-Killer-T-Zellen
NOS	Not otherwise specified
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PAS	Periodic Acid-Schiff
PARP	poly-ADP-Ribose-Polymerase

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSC	Peripheral Blood Stem Cells
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PI	Propidium Iodid
POX	Peroxidase
RHAMM	Receptor for hyaluronic acid-mediated mobility
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor
SCF	Stammzellfaktor
SD	Standardabweichung
TLR	Toll-like-receptor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	regulatorische T-Zelle
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Klinik, Diagnose und Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Neoplasie der Myelopoese. Die Inzidenz beträgt etwa 3,7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und steigt mit dem Alter an; das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 65 - 70 Jahren [1, 2].

Die klinischen Symptome sind vielfältig, unspezifisch und treten meist akut auf. Aufgrund der zunehmenden Infiltration des Knochenmarkes durch leukämische Blasten - hierbei handelt es sich um unreife, nicht differenzierte hämatopoetische Zellen - kommt es zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese. So sind die Symptome der Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, Dyspnoe und Blässe Ausdruck einer vorherrschenden Anämie. Die Neutropenie führt zur Infektanfälligkeit mit Fieber und bakteriellen Infektionen, aber auch zu Mykosen. Durch eine Thrombozytopenie (aufgrund der blastären Infiltration und Verdrängung der Thrombozytopoese) kommt es zu diffusen Einblutungen (Petechien) oder auch beispielsweise zu Zahnfleischbluten und Epistaxis. Eine Hepato-Splenomegalie, Lymphadenopathie oder Gingivahyperplasie können ebenfalls als Folge einer leukämischen Infiltration auftreten.

Zusätzlich kann es zur Hyperleukozytose (Leukozytenwerten $> 50.000/\mu\text{l}$) kommen. Infolge dessen kommt es zur Leukostase mit

Mikrozirkulationsstörungen, die sich einerseits auf die erhöhte Zellzahl, andererseits auch durch die vermehrte Adhäsion von Blasten auf Endothelien zurückführen lässt. Eine Hyperleukozytose kann sich unter anderem durch unspezifische neurologische Störungen, retinale Einblutungen oder auch pulmonale Verschattungen präsentieren. Die Hyperleukozytose stellt einen hämatologischen Notfall dar und bedarf einer umgehenden Therapieeinleitung mit einer systemischen Chemotherapie sowie supportiven Maßnahmen wie Flüssigkeitsbilanzierung, Harn-Alkalisierung, intensivmedizinischer Überwachung sowie ggf. einer notfallmäßigen Leukapherese [3].

Die Ätiologie der AML ist in den meisten Fällen unbekannt, jedoch stellt die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder zytotoxischen Substanzen ein erhöhtes Risiko dar. Als Folge einer Behandlung z.B. mit Topoisomerase-II-Inhibitoren oder Alkylantien kann es zum Auftreten einer therapieassoziierten AML kommen. Die Exposition gegenüber Umweltgiften spielt ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese. So haben Raucher und Exponierte gegenüber Benzol oder anderen aromatischen organischen Verbindungen ein erhöhtes Risiko an einer AML zu erkranken. Zusätzlich ist eine sekundäre AML als Folge eines myelodysplastischen Syndroms oder einer myeloproliferativen Neoplasie möglich [4, 5].

Obligat für die Diagnosestellung ist die Knochenmarkpunktion mit Durchführung einer Knochenmarkzytologie, Immunphänotypisierung, Zyto- und Molekulargenetik. Mit Hilfe der Knochenmarkzytologie lassen sich u.a. Zellularität (hyper- vs. hypozellulär), die Quantifizierung des Blastenanteils (\geq

20% Blasten ist diagnostisch beweisend für eine akute Leukämie) sowie ggf. dysplastische Veränderungen erfassen. Mit Hilfe von zytochemischen Färbungen (Myeloperoxidase = MPO, POX = Peroxidase, EST = Esterase) lässt sich die AML genauer klassifizieren.

Die Einteilung der AML nach der French-American-British-Klassifikation (FAB), die die AML-Blasten anhand der zytologischen Merkmale einteilt, wird heutzutage zwar noch gelegentlich durchgeführt, [6, 7], anstelle ihrer sollte aber besser die WHO 2016 Klassifikation verwendet werden. Diese berücksichtigt morphologische, immunphänotypische, klinische und genetische Besonderheiten, die aus einer Chromosomen- und FISH-Analyse gewonnen werden (siehe **Tabelle 1**) [8-10].

WHO 2008 Klassifikation akuter myeloischer Leukämien* 2008 und verwandter Vorläufer - Neoplasien und akute Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit [9]	
Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</p> <p>AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11</p> <p>APL (Akute Promyelozytenleukämie) mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA¹</p> <p>AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL²</p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</p> <p>AML mit inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1</p> <p>AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1</p> <p>Vorläufige Entität: AML mit mutiertem NPM1</p> <p>Vorläufige Entität: AML mit mutiertem CEBPA</p>
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen ³	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien ⁴	
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie (not otherwise specified, NOS)	<p>AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)</p> <p>AML ohne Ausreifung (FAB M1)</p> <p>AML mit Ausreifung (FAB M2)</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)</p> <p>Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a,b)</p> <p>Akute Erythroleukämie (FAB M6)</p> <p>- reine Erythroleukämie</p> <p>- Erythroleukämie, erythroid/myeloid</p> <p>Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelosis mit Myelofibrose (Syn.: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)</p>
Myeloisches Sarkom (Syn.: extramedullärer myeloischer Tumor; granulozytäres Sarkom; Chlorom)	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	<p>Transient abnormale Myelopoese (Syn.: Transientes myeloproliferatives Syndrom)</p> <p>Down-Syndrom assoziierte myeloische Leukämie</p>

Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	
<p>Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit</p>	<p>Akute undifferenzierte Leukämie</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1⁵</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und (v;11q23); MLL-Rearrangement</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch, (NOS)</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch, (NOS)</p> <p>Vorläufige Entität: Natural Killer (NK) Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom</p>
<p>*Für die Diagnose einer AML sind $\geq 20\%$ Blasten im Knochenmark erforderlich (Ausnahme: AML mit t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16) sowie einige Fälle von Erythroleukämien.</p> <p>¹ Weitere wiederkehrende Translokationen die RARA betreffen sind z.B.: AML mit t(11;17)(q23;q12)/ZBTB16-RARA; AML mit t(11;17)(q13;q12); NUMA1-RARA; AML mit t(5;17)(q35;q12); NPM1-RARA; oder AML mit STAT5B-RARA (beim letzteren wird ein normales Chromosom 17 mit konventioneller Zytogenetik gefunden).</p> <p>² Andere MLL Translokationen sollen entsprechend berichtet werden: z.B. AML mit t(6;11)(q27;q23); MLLT4-MLL; AML mit t(11;19)(q23;p13.3); MLL-MLLT1; AML mit t(11;19)(q23;p13.1); MLL-ELL; AML mit t(10;11)(p12;q23); MLLT10-MLL.</p> <p>³ Bei Kindern eher selten.</p> <p>⁴ Bei therapieassoziierten hämatologischen Neoplasien sind folgende zytotoxische Mittel impliziert: alkylierende Substanzen; ionisierende Bestrahlungstherapie; Topoisomerase II Inhibitoren; andere.</p> <p>⁵ BCR-ABL1 positive Leukämien können als akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp auftreten, sollten aber wie BCR-ABL1 positive Akute lymphoblastische Leukämie behandelt werden.</p>	

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML

1.1.1 Therapiemöglichkeiten der AML

Nach Diagnosestellung sollte unverzüglich eine Therapie eingeleitet werden. Hier stellt sich nun die Frage, ob ein kurativer oder palliativer Ansatz gewählt werden soll. Die Entscheidung ist abhängig vom biologischen Alter, von der Komorbidität, vom Patientenwunsch und vom genetischen Risikoprofil. Der kurative Therapieansatz besteht aus einer Induktionstherapie gefolgt von einer Postremissionstherapie (Konsolidierungs- und ggf. Erhaltungstherapie).

Als Standardtherapeutika bei der Chemotherapie gelten Cytarabin sowie ein zusätzliches Anthrazyklin, z. B. das „7+3“-Regime. Dieses Regime besteht aus der siebentägigen Gabe von Cytarabin sowie Daunorubicin für 3 Tage [11]. Mittlerweile gilt die sogenannte Doppelinduktion als Standard; hier wird ein zweiter Chemotherapiezyklus 2-3 Wochen nach dem ersten Zyklus verabreicht [12, 13]. Die Induktionschemotherapie sollte so schnell wie möglich nach Diagnosestellung erfolgen. Allein eine Therapieverzögerung von mehr als fünf Tagen führt bei jüngeren AML-Patienten zu einer Verschlechterung der Prognose [14].

Die Postremissionstherapie wird nach Induktion einer kompletten Remission (CR) oder inkompletten CR verabreicht. Definiert wird die CR durch einen Blastenanteil $< 5\%$ im Knochenmark, eine Normalisierung der peripheren Blutwerte, keine nachweisbaren Blasten im peripheren Blut und das Fehlen jeglicher extramedullärer Manifestationen.

Ziel der Postremissionstherapie ist es, residuelle leukämischen Zellen endgültig zu eliminieren. Die Therapie gliedert sich in die Konsolidierungstherapie und

ggfs. Erhaltungstherapie. Entscheidend für die Postremissionstherapie, im Gegensatz zur Induktionstherapie, ist das individuelle Risikoprofil der AML (insbesondere Genetik, aber auch individuelle Patientencharakteristika wie das Alter). Handelt es sich um eine Hochrisiko-AML wird eine allogene Stammzelltransplantation empfohlen [15], da diese die einzige Chance auf eine Heilung ermöglicht. Der wesentliche Vorteil der allogenen Stammzelltransplantation liegt im sog. Graft-versus-Leukämie Effekt (GvL). Im Wesentlichen wird dieser durch alloreaktive CD4- und CD8-positive T-Zellen vermittelt. Als Zielantigen der transplantierten T-Zellen zur Vermittlung des GvL-Effekts dienen HLA-Merkmale und Differenzierungsantigene der Blasten [10, 16, 17].

Bei einer allogenen Stammzelltransplantation kann als Komplikation eine durch T-Zellen vermittelte akute Graft-versus-host-Erkrankung (GvHD) auftreten. Hauptmanifestationsorte einer akuten GvHD sind Haut, Leber und Darm. Um einer akuten GvHD entgegenzuwirken, wird eine GvHD-Prophylaxe, angepasst an Remissionsstand, Alter des Patienten und der HLA Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, durchgeführt. Zu den möglichen Therapeutika zählen Cyclosporin A, Tacrolimus, Methotrexat, Mycophenolat Mofetil oder Anti-T-Zell-Immunglobulin, jeweils in verschiedenen Kombinationen [18, 19]. Die Therapie wird ergänzt durch Prednisolon und supportiven Maßnahmen, wie Flüssigkeitssubstitution, antibiotische, antivirale und antimykotische Prophylaxen, sowie parenterale Ernährung und Schmerztherapie [20]. Bei steroidrefraktärer GvHD gibt es in der Zweitlinientherapie weitere

Behandlungsmöglichkeiten, wie z.B. JAK-Inhibitoren, die extracorporale Photophorese, den Einsatz von monoklonalen Antikörpern oder die Gabe von mesenchymalen Stromazellen (MSC) [21-25].

Bei bis zu 50% der Transplantierten kann es zum Auftreten einer chronischen GvHD kommen (ab Tag 100 nach Transplantation). Diese führt, sowohl durch alloreaktive als auch autoreaktive T- und B-Zellen, zur chronischen Entzündung und Gewebsfibrosierung, ähnlich dem rheumatischen Formenkreis. Vor allem Haut, Augen, Mundschleimhaut, Speicheldrüsen, Darm, Leber, Faszien und Lunge sind davon betroffen [26-29]. In erster Linie wird bei der chronischen GvHD eine topische oder systemische Kortikosteroidtherapie durchgeführt. In schweren Fällen oder einer therapierefraktären chronischen GvHD, kann eine Kombinationsimmunsuppression (z.B. mit Cyclosporin A oder Tacrolimus) notwendig werden. Zusätzlich sollten physikalische Therapien und supportive Maßnahmen (Inhalativa, Antiinfektiva u. v. m.) angewendet werden [30, 31].

AML-Patienten mit günstigem Risikoprofil erhalten statt einer Stammzelltransplantation eine Konsolidierungstherapie mit hochdosiertem Cytarabin (bei älteren Patienten jedoch mit intermediär dosiertem Cytarabin aufgrund besserer Verträglichkeit). Auch mit dieser Therapie können bei einem substantiellen Anteil von Patienten Langzeitremissionen und Heilungen erzielt werden [32-35]. Alternativ besteht auch die Möglichkeit – nach erfolgter Induktionstherapie - einer monatlichen myelosuppressiven Erhaltungstherapie (6-Thioguanin, Cytarabin und Daunorubicin) über einen Zeitraum von bis zu drei Jahren [36].

1.2 Immunologie

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, körperfremde, potentiell gefährliche Antigene zu erkennen und zu eliminieren. Physikalische Barrieren, wie Epithelien, Mucus, Zilien und lösliche Proteine (z.B. Komplement System, Zytokine, Defensine, u. v. m.) bilden die erste Stufe der unspezifischen Abwehr gegen körperfremde Antigene. Die spätere Präsentation von Antigenen auf membrangebundenen Proteinen spielt eine wichtige Rolle, um das spezifische (adaptive) Immunsystem zu aktivieren [37-39]. Das adaptive Immunsystem, Hauptvertreter sind T- und B-Zellen, ist schließlich in der Lage, antigenspezifisch zu reagieren und z.B. gezielt mit Antikörpern Antigene auszuschalten. **Abbildung 1** zeigt einen Überblick über die grundlegenden Bestandteile des Immunsystems.

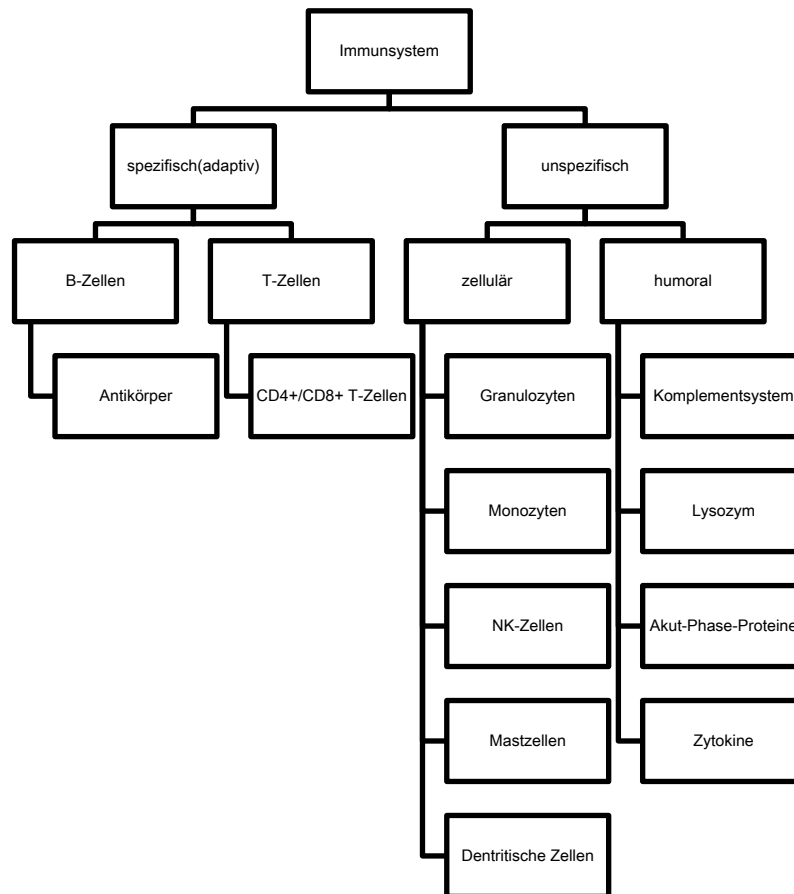


Abbildung 1: Bestandteile des Immunsystems

Alle zellulären Bestandteile entwickeln sich aus einer pluripotenten Stammzelle und differenzieren sich weiter in myeloische oder lymphoide Vorläuferzellen. Die lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren sich schließlich in B-, T-, NK- und NKT-Zellen. Myeloische Vorläuferzellen entwickeln sich zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Granulozyten. Mit Hilfe der *Cluster of Differentiation* (CD) können die Zellen aufgrund ihrer spezifischen Bindung von monoklonalen Antikörpern unterschieden werden. **Tabelle 2** zeigt einen Überblick der verschiedenen CD-Marker, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden. Die Auswahl der CD-Marker erfolgte einerseits mit dem Ziel, die verwendeten Zellen einwandfrei in der FACS-Analyse differenzieren zu können,

andererseits spiegeln sie die Aktivierung und den Aktivierungsgrad der einzelnen Zellen wider.

Eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielt auch der Major-Histocompatibility-Complex (MHC). Dabei handelt es sich um Oberflächenmoleküle, die körpereigene (MHC-I) oder körperfremde (MHC-II) Proteine präsentieren. Jede eukaryote Zelle exprimiert MHC-I und wird so als „körpereigen“ erkannt. Kommt es zu einer Veränderung der Proteinstruktur des MHC-I, z.B. durch eine Virusinfektion, wird die Veränderung der Proteinstruktur durch einen spezifischen T-Zell-Rezeptor einer CD8+ Zelle erkannt und die befallene Zelle so lysiert. Im Gegensatz zu MHC-I, präsentieren MHC-II-Moleküle Antigene den CD4+ T-Zellen, um so eine spezifische Immunantwort zu ermöglichen. MHC-II wird vor allem auf B- und dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert [40].

CD-Marker	Vorkommen	Funktion
CD4	Thymozyten, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Co-Rezeptor für MHC-II-Moleküle; Signaltransduktion
CD3	T-Zellen	T-Zell-Rezeptor, Signaltransduktion
CD8	Zytotoxische T-Zellen Regulatorische T-Zellen	Co-Rezeptor für MHC-I-Moleküle

CD38	Frühe B- und T-Zellen, Aktivierte T Zellen, Plasmazellen	erhöht B Zellproliferation, Ko- Stimulation
CD28	T-Zell Subpopulationen, Aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen	erhöhte Signalisierung durch Antigen Rezeptoren von B- und T-Zellen
CD58	Hämatopoetische und nicht- hämatopoetische Zellen	Leukozyten-Funktions-assoziertes Antigen-3 (LFA-3)
CD56	NK-Zellen	Adhäsionsmolekül
CD71	Alle proliferierenden Zellen	Transferrin Rezeptor
CD11b	Myeloide Zellen und NK- Zellen	Zelladhäsion, vermittelt Phagozytose über Komplementfaktoren
CD154	Aktivierte CD4 T-Zellen	Ligand für CD40, Verursacher von B- Zellen Proliferation und Aktivierung, Ko-Stimulation
CD16	Neutrophile, NK-Zellen, Makrophagen	Fc-Rezeptor, vermittelt Phagozytose
CD19	B-Zellen	Co-Rezeptor für B-Zellen

CD25	Aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen, B- Zellen und Monozyten Zellen, B-Zellen, und Monozyten	IL-2 Rezeptor
CD27	Medulläre Thymozyten, T- Zellen, NK-Zellen, einige B- Zellen	TNF Rezeptor
CD69	Aktivierte T-und B-Zellen, Aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	Unbekannt, frühes Aktivierungsantigen
CD40	B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, Basale Epithelzellen	Rezeptor für kostimulatorisches Signal für B-Zellen, Anregung von Wachstum, Differenzierung, Zytokin-Produktion durch Makrophagen und Dendritische Zellen
CD274	DZ, aktivierte T-Zellen, aktivierte Monozyten	B7 Homolog

Tabelle 2: CD-Marker unterschiedlicher Zelltypen

1.2.1 T-Zellen

T-Zellen sind mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in der Lage, über MHC-I oder MHC-II Antigene zu erkennen. Dabei gibt es zwei große Subpopulationen. Einerseits gibt es CD8⁺ T-Zellen, die primäre intrazellulär-infizierte Zellen als auch Tumorzellen abtöten, andererseits gibt es CD4⁺ T-Zellen, die die spezifische Immunantwort regulieren.

Jeder TCR ist einzigartig und antigen-spezifisch. Um jedoch diese Vielfalt an verschiedenen TCR zu erhalten, müssen die programmierenden Genabschnitte immer wieder neu miteinander rekombiniert werden. Diese große Variabilität der kodierenden Gene führt aber dazu, dass nicht funktionierende TCR entstehen können. Deshalb müssen die T-Zellen im Thymus reifen und selektiert werden [41-43]. Zuerst durchläuft die T-Zelle eine Positivselektion im Thymus-Kortex. Hier exprimiert sie sowohl CD4 als auch CD8. Bindet die Zelle an MHC-I, wird sie zur CD8⁺ T-Zelle, bei der Bindung an MHC-II wird die T-Zelle CD4⁺. Wird kein Rezeptor erkannt, wird die Apoptose eingeleitet [44, 45]. In der Thymus-Medulla erfolgt als letzter Schritt eine negative Selektion. Hier wird überprüft, ob die T-Zellen autoreaktive Eigenschaften besitzen. Sollte dies der Fall sein, wird auch hier die Apoptose induziert [46, 47].

Wird die CD4⁺ T-Zelle durch ein Antigen aktiviert, beginnt sie mit der Produktion von IL-2 und wird zur Th0-Zelle. Anwesende NK-Zellen, Granulozyten und Makrophagen beginnen ebenfalls mit der Produktion von Zytokinen. Dieses Zytokin-Mikromilieu führt schließlich dazu, dass sich Th0-Zellen in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen differenzieren. Jeder dieser Subtypen produziert schließlich

spezifische Zytokine um die Immunantwort zu modulieren. Th1-Zellen unterstützen die zell-vermittelte Immunantwort und Th2-Zellen die allergische und humorale Immunantwort. Th17-Zellen aktivieren neutrophile Granulozyten und sind an Autoimmunerkrankungen beteiligt [48-50]. Des Weiteren können CD4⁺ T-Zellen über Bindung an den MHC-II von aktivierten B-Zellen, unter Verwendung von Co-Rezeptoren (CD80, CD86 und CD40), einen Immunglobulin-Isotyp Wechsel initiieren. Dieser Schritt ist essentiell für die adaptive Immunantwort [47]. Ein anderer Teil der CD4⁺ Zellen sind sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg). Sie modulieren die Immunantwort nach unten oder regulieren die T-Zell-Reifung im Thymus [51].

Die über MHC-I aktivierten CD8⁺ T-Zellen können ihre zytotoxische Funktion auf zwei Arten entfalten. So sezerniert die T-Zelle Perforin, welches zur Zerstörung der Zellwand führt. Granzyme B, eine Serinprotease, kann dann in die Zielzelle eindringen und löst somit die Apoptose aus. Alternativ kann die CD8⁺ T-Zelle über den FAS-Rezeptor an den FAS-Liganden der Zielzelle binden und auch so die Apoptose initiieren [52].

1.2.2 NK-Zellen

NK-Zellen sind zytotoxisch und produzieren Zytokine [53]. Zirka 15 % der humanen Lymphozyten sind NK-Zellen, die sich typischerweise durch die Expression von CD56 identifizieren lassen [54]. Die Aufgabe der NK-Zellen besteht darin, virusinfizierte Zellen und Tumorzellen mit verändertem oder

fehlendem MHC-I Rezeptor zu erkennen und zu vernichten [55-57]. Prinzipiell stehen der NK-Zelle mehrere Abwehrmechanismen zur Verfügung. So produzieren sie Interferone, die einerseits die Immunantwort modulieren, um die adaptive Immunantwort vorzubereiten, andererseits bewirken Interferone eine Hemmung der Angiogenese, was wiederum zu einer Einschränkung des Tumorwachstums führt. Zusätzlich enthalten NK-Zellen Granula, die Perforin und Granzyme enthalten. Perforin bindet an die Zellmembran der Zielzelle und unterbricht die Zellmembranintegrität indem es Poren formt. Die Aufnahme von Granzymen, dabei handelt es sich um Serinproteasen, erfolgt rezeptorvermittelt durch Endozytose. Granzyme initiieren einerseits bereits selbst die Apoptose der Zielzelle, andererseits aktivieren sie Caspasen (Proteasen), die wiederum auch die Apoptose einleiten [58-60]. Sie produzieren TNF, welcher an membrangebundene Proteine - den TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) - bindet und so die Apoptose der Zielzelle auslöst [61]. Alternativ dazu können NK-Zellen das Wachstum von Tumorzellen bremsen. NK-Zellen exprimieren den FAS-Liganden und schütten Interferone aus. Diese bewirken, dass Tumorzellen den FAS-Rezeptor zu bilden beginnen und schließlich der FAS-Ligand der NK-Zellen daran bindet. Die Aktivierung des FAS-Rezeptors führt zur Induktion der Apoptose [62, 63].

1.2.3. Überblick Immuntherapie

Eine Schlüsselrolle in der Immuntherapie spielen zytotoxische und regulatorische T-Zellen. Eine alleinige Aktivierung der T-Zellen über einen TCR ist jedoch nicht ausreichend und noch zusätzliche ko-stimulatorische Signale werden dazu benötigt (z.B. Zytokine oder aktivierende Rezeptoren). Ebenso ist die Deaktivierung einer zytotoxischen T-Zelle über die Aktivierung von Immuncheckpoints wie *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) oder *programmed cell death 1* (PD-1) möglich. Diese Mechanismen führen zur Unterdrückung der Immunantwort [64, 65].

Mit Hilfe von sogenannten Checkpointinhibitoren kann man in den Aktivierungsprozess von T-Zellen eingreifen. So können bereits in der Aktivierungsphase von T-Zellen mittels eines CTLA-4-Inhibitors (z.B. Ipilimumab), die inhibierenden Prozesse von CTLA-4 unterdrückt werden. Tumorzellen können durch die Expression von *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) die Immunantwort unterdrücken, indem sie den PD-Rezeptor an T-Zellen binden und damit T-Zellen deaktivieren. Zum Einsatz kommen hier PD-1-Inhibitoren (z.B. Pembrolizumab) oder PD-L1-Inhibitoren (z.B. Avelumab), die über die Blockade dieser inhibierenden Rezeptoren wieder eine Immunreaktion ermöglichen können. Verwendung findet diese Therapie z. B. in der Behandlung von Bronchialkarzinomen oder Blasentumoren [66, 67].

Die adoptive T-Zell-Therapie ist eine andere Möglichkeit der Immuntherapie und erzielt vor allem bei hämatologischen Neoplasien Erfolge. Die durch Leukapherese gewonnen T-Zellen werden mit einem chimären,

tumorspezifischen und extrazellulären Antikörperfragment bestückt, der mit einem intrazellulärem TCR gekoppelt ist und zur Aktivierung der T-Zellen führt. Die Zellen werden ex-vivo expandiert und dem Patienten reinfundiert. Die veränderten T-Zellen (sog. CAR-T-Zellen) eliminieren somit spezifisch und MHC-unabhängig ausgewählte Tumore und sind bei pädiatrischen akuten B-Zell-Leukämien bereits zugelassen [68].

Das Feld der Immuntherapien ist weit. **Tabelle 3** zeigt einen Überblick über bereits vorhandene und in Studien befindliche Therapiemöglichkeiten [66].

Immunmodulatorische Monoklonale Antikörper
Tumorstoffe
Onkolytische Viren
Pattern recognition receptors
Makrophagenprogrammierung
Inhibitoren des immunmodulatorischen Metabolismus
Immunmodulatorische Zytokine
Adoptiver Zelltransfer
Monoklonale Antikörper gegen spezifische Tumore
Immunogene Induktoren des Zelltods

Tabelle 3: Formen der Immuntherapie [66]

1.2.4. Immuntherapie der AML

Aufgrund der schlechten Prognose bei Patienten mit einer AML wird schon seit längerem versucht, auch das eigene Immunsystem zur Leukämiebekämpfung heranzuziehen. Ein erfolgreicher Ansatz zur Behandlung der AML ist die Kombination aus IL-2, einem NK- und T-Zellen stimulierendem Zytokin, mit Histamin-Dihydrochlorid (HDC). Diese Kombination zeigt einen signifikanten antileukämischen Effekt. IL-2 vermittelt hier eine vermehrte Lyse der Blasten durch stimulierte NK-Zellen. Dies tritt allerdings nur dann auf, wenn die IL-2 Gabe gleichzeitig mit HDC erfolgt, da HDC die inhibierenden Effekte von Granulozyten und Monozyten auf die durch IL-2 aktivierten NK-Zellen aufhebt [69-72]. In einer klinischen Studie unter der Kombinationstherapie von IL-2 und HDC zeigte sich bei 67% der Patienten ein rezidivfreies 2-Jahresüberleben, im Gegensatz zu 11% Rezidivfreiheit in der Kontrollgruppe [73].

Ebenfalls zählt die schon seit langem etablierte allogene Stammzelltransplantation zur Gruppe der Immuntherapien. Dabei kommt es durch T-Zellen und NK-Zellen zum Graft-versus-Leukämie Effekt [74]. Patienten nach allogener Stammzelltransplantation steht auch eine weitere zelluläre Immuntherapie zur Verfügung. Kommt es bei dieser Patientengruppe zu einem Rezidiv, werden dem Stammzell-Spender Lymphozyten entnommen und anschließend dem Patienten übertragen. Dadurch kommt es zu einem erneuten, vor allem durch T-Zellen vermittelten, Graft-versus-Leukämie-Effekt. Eine bereits bestehende GvHD wird durch diese Therapie verschlimmert, oder es kann zum Neuauftreten einer GvHD kommen [75].

1.3 Microenvironment im Knochenmark

Das Knochenmark enthält hämatopoetische Stammzellen, Endothelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und mesenchymalen Stammzellen, die sich wiederum in Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und Myozyten differenzieren können. Ergänzt wird dieses Mikromilieu durch eine große Anzahl von nicht zellulären Faktoren [76]. Es wird vermutet, dass diese Vielzahl an Zellen Nischen ausbildet. Die Osteoblasten-Nische oder endostale Nische (Stammzellnische) besteht u. a. aus Osteoblasten und mesenchymalen Stromazellen (MSC), welche regulatorischen Einfluss auf die hämatopoetischen Stammzellen sowie AML-Blasten nehmen [77, 78]. Endothelzellen bilden die vaskuläre Nische, die Anschluss an das Gefäßsystem findet. Die sich hier befindenden Stammzellen differenzieren sich aus und die entdifferenzierten Zellen können somit in Blut abgegeben werden [79]. Es konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen das Überleben von leukämischen Stammzellen drastisch, sowohl in-vitro als auch in-vivo, erhöhen. Verantwortlich dafür sind sowohl Zell-Zell-Kontakte als auch lösliche Faktoren, die von den mesenchymalen Stromazellen gebildet werden [80, 81]. Zusätzlich beeinflussen mesenchymale Stromazellen den Energiestoffwechsel von leukämischen Zellen [82, 83]. Einer der möglichen antiapoptotischen Wirkungen von mesenchymalen Stromazellen auf leukämische Zellen und der damit einhergehenden Chemotherapie-Resistenz beruht auf einer vermehrten Expression von BCL-2, einem antiapoptotischen Protein [84].

Von den nicht-zellulären Komponenten nimmt die physiologische Hypoxie einen wichtigen Stellenwert ein. So konnte bereits gezeigt werden, dass im Knochenmark und in der Stammzellnische, hypoxische Bedingungen von 1 - 6% (Standardlaborbedingungen, also Raumluft: 21% O₂) vorliegen. Die Hypoxie beeinflusst sowohl Zell-Signal-Wege als auch die Verankerung im Knochenmark, die Proliferation und die Differenzierung der AML-Blasten [85, 86]. Werden AML-Blasten hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, führt dies zu einem Zell-Zyklus-Arrest. Dieser Arrest führt unter anderem zu einer verminderten Zytotoxizität von Cytarabin [87]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AML-Blasten vermehrt IL-8 unter Hypoxie produzieren. IL-8 führt schließlich zu einer vermehrten Zuwanderung von MSC, was wiederum die Ausbildung einer Stammzellnische fördert [88].

Aber nicht nur AML-Blasten werden durch hypoxische Bedingungen beeinflusst, sondern auch T- und NK-Zellen. Ein hypoxisches lokales Tumor-Microenvironment führt zu einer vermehrten extrazellulären Adenosin-Kumulation sowie zu einer zusätzlichen Produktion von Adenosin durch regulatorische T-Zellen. Dies führt nun über intrazelluläre Signalwege zu einer Immunsuppression von T-Zellen. Zusätzlich kommt es zu einer durch HIF-1 α vermittelten Blockade des TCR [89].

NK-Zellen verlieren unter hypoxischen Bedingungen die Möglichkeit, aktivierende Rezeptoren, auf die Zytokine wirken (z. B. IL-2), auszubilden. Dies geht mit einer verminderten Tumorzell-Lyse einher. Interessanterweise wird die Antikörper-vermittelte Lyse von Zellen nicht beeinflusst [90]. Für solide Tumore

mit intratumoralen Hypoxie konnte auch bereits gezeigt werden, dass sie lösliche Faktoren sezernieren, die ebenfalls zu einer Reduktion von Rezeptoren auf NK-Zellen führen [91].

1.4 Fragestellung

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine maligne Erkrankung der Hämatopoese, die trotz intensiver Chemotherapie häufig rezidiert. Besonders gefährdet sind Patienten mit Hochrisiko-AML und ältere Patienten, die keine intensive Therapie erhalten können. Insbesondere für diese Patientengruppen sind neue Therapieansätze nötig.

Bei Hochrisiko-Patienten bietet nur die allogene Stammzelltransplantation eine Chance auf Heilung. Relevant für die therapeutische Wirksamkeit ist in 1. Linie der Graft-versus-Leukemia-Effekt, also die immunologische Reaktion des transplantierten Immunsystems (insbesondere der T-Zellen) gegen die residuellen leukämischen Blasten des Empfängers. Zwar dient dies als *proof of principle* der Effektivität der Immuntherapie in der AML, andere immuntherapeutische Ansätze blieben aber bis dato hinter den Erwartungen zurück.

Mögliche Gründe dafür könnten im protektiven Milieu des Microenvironments im Knochenmark liegen, welches (I) die Reaktivität von Immuneffektorzellen negativ beeinflusst und / oder (II) Blasten vor einer Immunreaktion schützen könnte.

Im Rahmen dieser Dissertation soll daher der Einfluss des Microenvironments auf die Zell-Lyse von Effektorzellen des Immunsystems bei der AML untersucht werden. Im Detail wurden folgende Fragen näher betrachtet:

- Welchen Einfluss hat die physiologische Hypoxie als Bestandteil des nicht-zellulären Microenvironments im Knochenmark auf die Aktivierung von NK- und T-Zellen?
- Ändert ein hypoxisches Microenvironment die Immunantwort (Zell-Lyse) durch NK- und T-Zellen gegenüber AML-Blasten *in-vitro*?
- Besitzen mesenchymale Stromazellen als Bestandteile des zellulären Microenvironments im Knochenmark einen protektiven Einfluss auf AML Blasten gegenüber zellvermittelter Lyse?
- Welche Mechanismen sind ggf. bei dieser Protektion gegenüber zellvermittelter Lyse beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

Aqua dest.	Delta Pharma GmbH (Pfullingen, D)
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml mit Deckel	Eppendorf (Hamburg, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Handschuhe: SemperCare	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, A)
Kryoröhrchen 2 ml	CORNING (New York, USA)
Microtube 2 ml	SARSTEDT (Nümbrecht, D)
Mikroskop Primovort	Zeiss (Göttingen, D)
Pipetboy	INTEGRA BIOSIENCE (Fernwald, D)
Pipetten (2,5,10, 25, 50 ml)	BD Falcon (Heidelberg, D)
Pipettenspitzen	SARSTEDT (Nümbrecht, D)
Röhrchen (20, 50 ml)	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D)
Sterilwerkbank LaminaFlow MD14	Camfil (Trosa, S)
Vortexer VORTEX-GENIE	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus (Hanau, D)

2.2 Zellkultur

2.2.1. Materialien

BSA (Albumin Fraktion V)	AppliChem (Darmstadt, D)
DMSO	Serva (Heidelberg, D)
EDTA	AppliChem (Darmstadt, D)
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom (Berlin, D)
Hypoxie Arbeitsstation INVIVO ₂ 400	Ruskin Technology (Pencoed, UK)
L-Glutamin 200 mM	Life Technologies (Darmstadt, D)
PBS (Instamed)	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (1000 µg/ml)	Life Technologies (Darmstadt, D)
RPML-1640-Medium	Biochrom (Berlin, D)
Trypsin 10x	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Zellkulturflaschen (75/150 cm ²)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatten (6-, 12-Well)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Zellen wurden immer bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Ansatz erfolgte entweder eine Inkubation bei Raumluft (21% O₂) oder bei 1% O₂ mit Hilfe einer Hypoxie-Arbeitsstation über den jeweils angegebenen Zeitraum bei entsprechendem Experiment. Falls nicht anders angegeben, wurde RPMI-1640 Medium mit 10%igem fetalem Kälberserum sowie Glutamin (2mM) und 1%igem Penicillin + Streptomycin verwendet.

Zell-Linien:

Zelllinie K562 (DSMZ, Braunschweig, D). Hierbei handelt es sich um eine humane CML-Zelllinie in Blastenkrise.

Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° C kultiviert. In 500 ml RPMI-1640-Medium wurde zusätzlich FCS (hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56° C) hinzugefügt. Je nach Zellzahl wurden die Zellen alle 3 – 4 Tage 1:5 – 1:10 gesplittet und mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ /ml weiter kultiviert.

Stromazelllinien: In den verschiedenen Ko-Kultur Experimenten wurde die murine MS-5 Stromazelllinie (DSMZ, Braunschweig, D) verwendet. Zusätzlich dazu die murinen Stromazelllinien, EL08-1D2 und EL28-1B3. Das Besondere an der Zelllinie EL08-1D2 (embryonale Leber-Stromazelle) ist, dass sie ex-vivo das Überleben von HSC sichert sowie zu deren Ausreifung führt (support).

Verantwortlich dafür sind Botenstoffe, wie Fibroblast Growth Factor, Insulin-like Growth Factor. Als Kontrolle für die verschiedenen Ko-Kultur-Experimente wurde die Zelllinie EL28-1B3 verwendet, die die Eigenschaften des Supports der Stammzellen nicht besitzt (non-support). Die Stromazellen wurden von Prof. Dr. Robert Oostendorp, Klinikum der Technischen Universität München, zur Verfügung gestellt [92, 93]. Die Stromazellen wurden in 150 cm² Zellkulturflaschen kultiviert (Ziel: 50.000/μL), alle 3 - 4 Tage wurde die Kultur geteilt. Dazu erfolgte die Lösung der Stromazellen mit Hilfe von Trypsin (Trypsin 10x 1:10 mit PBS verdünnt) für 10 Minuten bei 37° C. Nach der Inkubationszeit wurden mit RMPI-Medium die Wände der Zellkulturflasche mehrmals abgespült und der ganze Inhalt der Zellkulturflasche wurde mit einer Pipette in ein 50 ml Röhrchen übertragen und anschließend zentrifugiert (5 Minuten bei 1500 RPM). Das entstandene Pellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen übertragen (50.000/μl).

Lymphozyten (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC): Die gewonnenen Zellen stammten alle von freiwilligen, gesunden Probanden, denen peripheres Blut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, D) entnommen wurde. Anschließend wurden PBMC über eine Dichtezentrifugation gewonnen und kultiviert. Zum Procedere siehe Kapitel 2.3. Angereicherte PBMC wurden in einer Konzentration von 1x10⁶/ml kultiviert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen in 21% O₂ oder 1% O₂ bei 37° C für maximal 48 Stunden kultiviert.

Primäre AML-Blasten: Zur Verwendung kamen Zellen, die für Routineuntersuchungen im Rahmen der Leukämiediagnostik gewonnen und nicht komplett für die Diagnostik verbraucht wurden. Ein Ethikvotum sowie die schriftliche Einwilligung der Patienten zur Verwendung dieser Zellen lagen vor. Zur Separation der Zellen siehe Kapitel 2.3. Die AML-Zellen wurden nach Ficoll-Dichtezentrifugation bei -80° C mit FCS und 10% DMSO konserviert. Nach Bedarf wurden die Zellen aufgetaut, in ein 50 ml Röhrchen übertragen, sofort mit RPMI-Medium (1:10) verdünnt und abzentrifugiert (5 Minuten bei 1500 RPM). Danach erfolgte ein einmaliges Waschen mit 50 ml RPMI-Medium. Anschließend wurden die Zellen sofort für die jeweiligen Versuche verwendet.

2.2.2 Trypanblau-Färbung und Zellzählung

Neubauer-Zählkammer	LO-Labor GmbH (Friedrichsdorf, D)
Trypan Blau Lösung 0,4%	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Zellkulturplatte (96-Well)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Blau gefärbte und daher avitale Zellen wurden nicht mitgezählt. Zunächst wurden dafür 50µl einer gut homogenisierten Zellsuspension in eine 96er-Well Platte überführt und mit 50 µl einer 0,4 % Trypan Blau Lösung vermischt. Danach wurde die Suspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die vitalen Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$N = \frac{n * 1000}{0,1 * 0,5 * 4}$$

N: Zellzahl/ml Zellsuspension,

n: Anzahl vitaler Zellen

0,1: Kammerfaktor

0,5: Verdünnung 1:2 (50 µl + 50 µl)

4: Anzahl der ausgezählten Quadrante

2.3 Separation der PBMC und AML-Blasten

Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom (Berlin, D)
BSA	AppliChem (Darmstadt, D)
CD3 MicroBeads, human	MiltenyiBiotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
DMSO	SERVA (Heidelberg, D)
EDTA	AppliChem (Darmstadt, D)
Erythrozytenlysepuffer (EasyLyse 1x)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom (Berlin, D)
MS Column	MiltenyiBiotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
NK Cell Biotin-Antibody Cocktail, human	MiltenyiBiotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
NK Cell MicroBead Cocktail, human	MiltenyiBiotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
PBS	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RPMI-1640-Medium	Biochrom (Berlin, D)

Mononukleäre Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation angereichert.

Dazu wurde als Erstes mittels EDTA antikoaguliertes Knochenmark- oder

peripheres Blut in 50ml Röhrchen übertragen und 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Vollblut mit einer Pipette langsam auf 15 ml Ficoll-Lösung in einem zweiten 50 ml Röhrchen geschichtet, 20 min bei 2000 RPM zentrifugiert und ohne Zentrifugenbremse auslaufen gelassen. Dadurch kommt es zu einer Trennung einzelner Blutbestandteile (sog. Phasen) und zur Ausbildung einer Interphase (oder „Buffy-coat“), die die PBMC oder AML-Blasten enthält. Die Interphase wurde mit einer Pipette aufgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen übertragen, mit RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert (1500 RPM für 5 Minuten). Der Überstand wurde abgegossen, das entstandene Pellet in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 4° C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 50 ml RPMI aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium übertragen.

2.3.1. Selektion der einzelnen Lymphozytenfraktionen

NK- und T-Zellen wurden mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) separiert. MACS macht sich die Expression spezifischer Oberflächenmerkmale verschiedener Zelltypen zunutze und markiert die Zellen durch entsprechende metallbeladene Antikörper. Zur Selektion wurde die Suspension in eine magnetische Säule gegeben, und die mittels Antikörper markierten Zellen hafteten an der magnetischen Säule an und konnten so selektioniert werden

(*positive* Selektion). Das Eluat hingegen ist von den markierten Zellen depletiert (*negative* Selektion). Zur Selektion wurden ein MACS Separator und verschiedene MACS Säulen (MS) verwendet.

Alle NK-Zellen wurden negativ selektioniert. Die folgenden Angaben beziehen sich immer auf 10^7 Zellen. Zuerst wurde mit der Herstellung eines MACS Puffer (PBS, 0,5% BSA und 2 mM EDTA) begonnen. Dann erfolgte eine Zellzählung mit Trypanblau. Nach dem Abzentrifugieren (1500 RPM für 5 Minuten) und der Aufnahme des Pellets in 40 μ l MACS Puffer wurde 10 μ l NK-Cell-Biotin-Antibody-Cocktail hinzugegeben. Danach wurde für 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Dann wurde 30 μ l MACS Puffer mit 20 μ l NK-Cell-MicroBead-Cocktail hinzugegeben und erneut für 15 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 – 2 ml MACS Puffer zum Stoppen der Reaktion und die Zentrifugation bei 1500 RPM für 5 Minuten. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und das Pellets in 500 μ l MACS Puffer aufgenommen.

Das Befüllen der MACS Säule mit der Zellsuspension erfolgte im nächsten Schritt. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Zellsuspension wurde dreimalig die MACS Säule mit jeweils 500 μ l Puffer gespült. Die durchgelaufene Zellsuspension entsprach schließlich den NK-Zellen. Die MACS Säule wurde aus dem Separator entfernt und mit 1 ml Puffer in ein neues Röhrchen gespült. Diese Zellsuspension entsprach der (magnetisch gelabelten) Rest-Population der PBMC.

Alle T-Zellen wurden positiv selektioniert. Die folgenden Angaben beziehen sich immer auf 10^7 Zellen. Zuerst erfolgte die Herstellung eines MACS Puffers (PBS,

0,5% BSA und 2 mM EDTA), danach eine Zellzählung mit Trypanblau. Nach dem Abzentrifugieren (1500 RPM für 5 Minuten) und Aufnehmen des Pellets in 80 µl MACS Puffer, wurde CD3-MicroBead-Cocktail hinzugegeben und alles 10 Minuten bei 4° C inkubiert. Dann wurde 1 – 2 ml MACS Puffer zum Stoppen der Reaktion hinzugefügt und danach zentrifugiert (1500 RPM für 5 Minuten). Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 µl MACS Puffer übertragen.

Dann erfolgte das Befüllen der MACS Säule mit der Zellsuspension. Nach dem vollständigen Durchlaufen der Zellsuspension wurde dreimalig die MACS Säule mit jeweils 500 µl Puffer gespült. Die durchgelaufene Zellsuspension entsprach der Restpopulation der PBMC. Die MACS Säule wurde aus dem Separator entfernt und mit 1 ml Puffer in ein neues Röhrchen gespült. Diese Zellsuspension entsprach den (magnetisch gelabelten) T-Zellen.

2.4. Durchflusszytometrie (FACS)

BSA	AppliChem (Darmstadt, D)
D-PBS	Lifetechnologies (Karlsruhe, D)
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
EDTA	AppliChem (Darmstadt, D)
FACS Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg, D)
Software CellQuestPro	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen einer Zellsuspension durch eine Kapillare gesogen und während der Passage mit einem Laserstrahl angeregt. Das dadurch entstandene Streulicht wird detektiert und spiegelt einerseits die Größe der jeweiligen Zelle (Forward Scatter) und andererseits die Granularität (Side Scatter) wieder. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von fluoreszenzfarbstoffgebundenen Antikörpern spezielle Oberflächen-, aber auch intrazelluläre Antigene darzustellen. Zur Detektion werden dazu Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge (= Farbe) verwendet. Die Auswertung dieser Messergebnisse erfolgt mithilfe spezialisierter Software (z.B. CellQuest®). Als Trägersubstanz wurde ein FACS-Puffer (D-PBS + Aqua dest. (1:10) + 0,1% BSA + 2 mM EDTA) verwendet.

2.4.1 FACS Färbungen

CD 45 APC (2 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille, F)
APC IgG (5 µl / 500 µl FACS-Puffer)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
CD 56 APC (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
CD 69 PE (5 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
PE IgG (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)
CD4 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD3 PerCP (5 µl / 500 µl FACS-Puffer)	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)
CD8 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD38 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD28 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD58 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD71 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD11b PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD154 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD16 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD19 FITC (5 µl / 500 µl FACS-Puffer)	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)

CD 19 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD25 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD27 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
FITC IgG (5 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD40 PE (10 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)
CD274 PE (3 µl / 500 µl FACS-Puffer)	Beckman Coulter Company (Marseille F)

Die Tabelle zeigt alle für diese Dissertation verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper. Jeder dieser Antikörper bindet spezifisch an das für ihn vorgesehene Oberflächenmerkmal. An diese Antikörper sind Fluoreszenzfarbstoffe (PE, FITC, APC, PerCP) gekoppelt, die unterschiedliche Emissions- und Absorptionsspektren haben. Während der Messung werden die gefärbten Zellen mit einem zum Fluoreszenzfarbstoff passenden Laser angeregt und emittieren Licht in einer bestimmten Wellenlänge, welche im Durchflusszytometer detektiert wird. Als Negativkontrolle werden Isotypkontrollen durchgeführt, um die unspezifische Bindung der jeweiligen Antikörper zu bestimmen.

Zur Färbung der Zellen wurde zunächst das Zellpellet in ein 50 ml Tube mit FACS-Puffer übertragen. Danach wurde die Zellsuspension (500 µl) in ein FACS-Röhrchen umgefüllt und der jeweilige fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben (Menge nach Herstellerangaben). Danach erfolgte die Inkubation

bei 4° C für 10 Minuten in Dunkelheit. Schließlich wurde erneut zentrifugiert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Messung der Zellen erfolgte in FACS-Puffer in FACS-Röhrchen.

2.5 Lyse Assay

2.5.1 Durchführung

Calcein AM (1 mg/ml in 100 µl DMSO)	LifeTechnologies (Karlsruhe, D)
CD45-APC	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
D-PBS	LifeTechnologies (Karlsruhe, D)
IL-2	Sigma Aldrich (München, D)
Propidium-Jodid 25 mg Stocklösung: 5 mg/ml (gelöst in DMSO) Working-Solution: 50 µg/ml (Stocklösung 1:100 mit D-PBS verdünnt)	Lifetechnologies (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640-Medium	Biochrom (Berlin, D)
Zellkulturplatten (12 Well, 96 Well)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

Als Erstes erfolgte die Messung der Zellzahl von Targetzellen (primäre AML-Blasten oder K562-Zellen) und Effektor-Zellen (PBMC / T-Zellen/ NK-Zellen) mittels Trypan Blau Zählung und Einstellung auf folgende Konzentrationen:

- Targetzellen (T): 30.000/ml
- Effektorzellen (E): $2,5 \times 10^6$ /ml

Zum Anfärben der Targetzellen wurden 2 μ l Calcein pro 10 ml Medium hinzugefügt, gut vermischt und anschließend drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit RMPI-Medium gewaschen. Anschließend wurden Effektor- zu Targetzell Ratios (E:T) im Verhältnis von 5:1 bis 80:1 in einer 96- oder 12-Well Platte hergestellt. **Abbildung 2** zeigt exemplarisch einen Versuchsaufbau. Der Versuchsaufbau wurde schließlich für vier Stunden unter den gewünschten Bedingungen inkubiert (37° C, 5% CO₂, sowie 21% und 1% O₂).

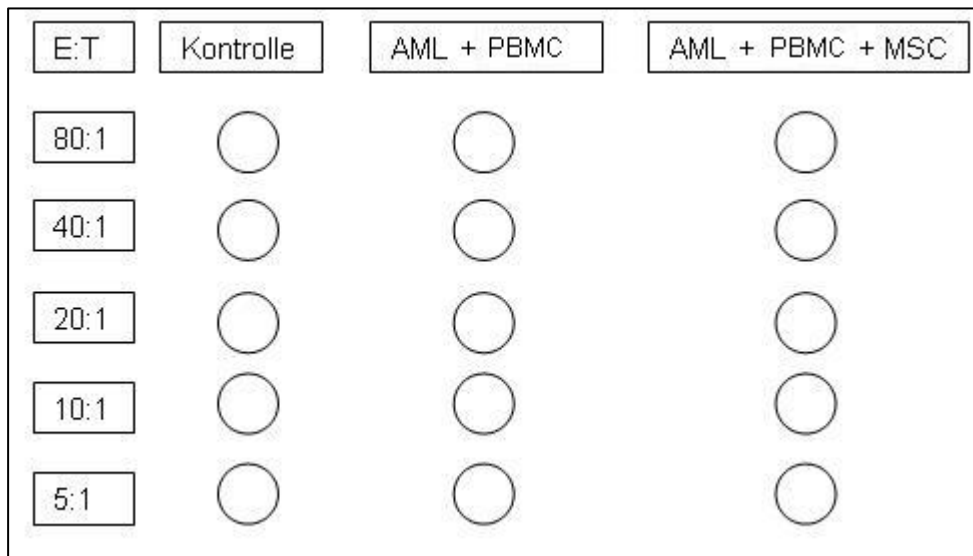


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer 96 Well-Platte mit Verdünnungsreihen für einen Lyse Assay mit verschiedenen E:T Ratios

Für Ko-Kultur Experimente mit MSC wurden diese in einer Konzentration von $5 \times 10^4/\text{ml}$ 24 Stunden in einer 12-Well Platte prä-inkubiert. Nach optischer Kontrolle der Adhärenz der MSC wurde der Überstand entfernt und Calcein gelabelte Targetzellen und Effektorzellen zugegeben. Der Ansatz wurde dann wie oben beschrieben durchgeführt.

2.5.2 Auswertung

Nach 4-stündiger Inkubationsdauer wurden die Zellsuspensionen in FACS Röhrchen überführt, zentrifugiert, danach mit RPMI-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 500 µl FACS Puffer überführt und mit 10 µl Propidium Iodid Lösung (PI) angefärbt. Die von den Effektorzellen lysierten, also PI positiven, Targetzellen, wurden dann mittels FACS gemessen und so die Effektivität der NK oder T-Zell vermittelten Lyse bestimmt.

Für Ko-Kultur Experimente wurden zuerst die Zellsuspensionen in FACS Röhrchen übertragen. Die adhären MSC wurden anschließend mit 1 ml Trypsin bei 37° C für 10 Minuten inkubiert, somit aus den Platten gelöst und anschließend mit Medium verdünnt und ebenfalls in das passende FACS Röhrchen übertragen. Nach einmaligem Waschen erfolgte schließlich die Anfärbung der Zellsuspension für 10 Minuten bei 4° C in Dunkelheit mit 2 µl CD45-APC Antikörper. Danach folgte ein erneutes Waschen mit anschließender Anfärbung der Zellen mit PI und darauffolgender FACS Messung. Mit Hilfe von CD45 (nur von hämatopoetischen Zellen exprimiert) konnte später in der FACS Messung zwischen Effektor-, Target- und Stromazellen (die kein CD45 exprimieren) unterschieden werden.

2.5.3. Auswertung und Gating-Strategie der Ko-Kultur Experimente mittels

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Um die NK-Zell-vermittelte Lyse ohne radioaktives Assay messen zu können, wurde eine FACS-basierte Methode etabliert. **Abbildung 3** zeigt exemplarisch die Auswertung und Gating Strategie der lysierten K562 Zellen bei einer E:T von 20:1. **Abbildung 3a** zeigt die Calcein positiven Targetzellen (hier K562, 99% im Gate R3). **Abbildung 3b** repräsentiert die Calcein negativen Effektorzellen (1% im Gate R3). **Abbildung 3c** zeigt eine E:T von 20:1 mit PI positiven, durch PBMC lysierten Targetzellen (PI und Calcein positiv). Mit Hilfe des Gates (R3) betrachtet man ausschließlich Calcein und PI positive Zellen und kann so den lysierten Prozentanteil (PI positiv von Calcein positiv) der Targetzellen messen (**Abbildung 3d**).

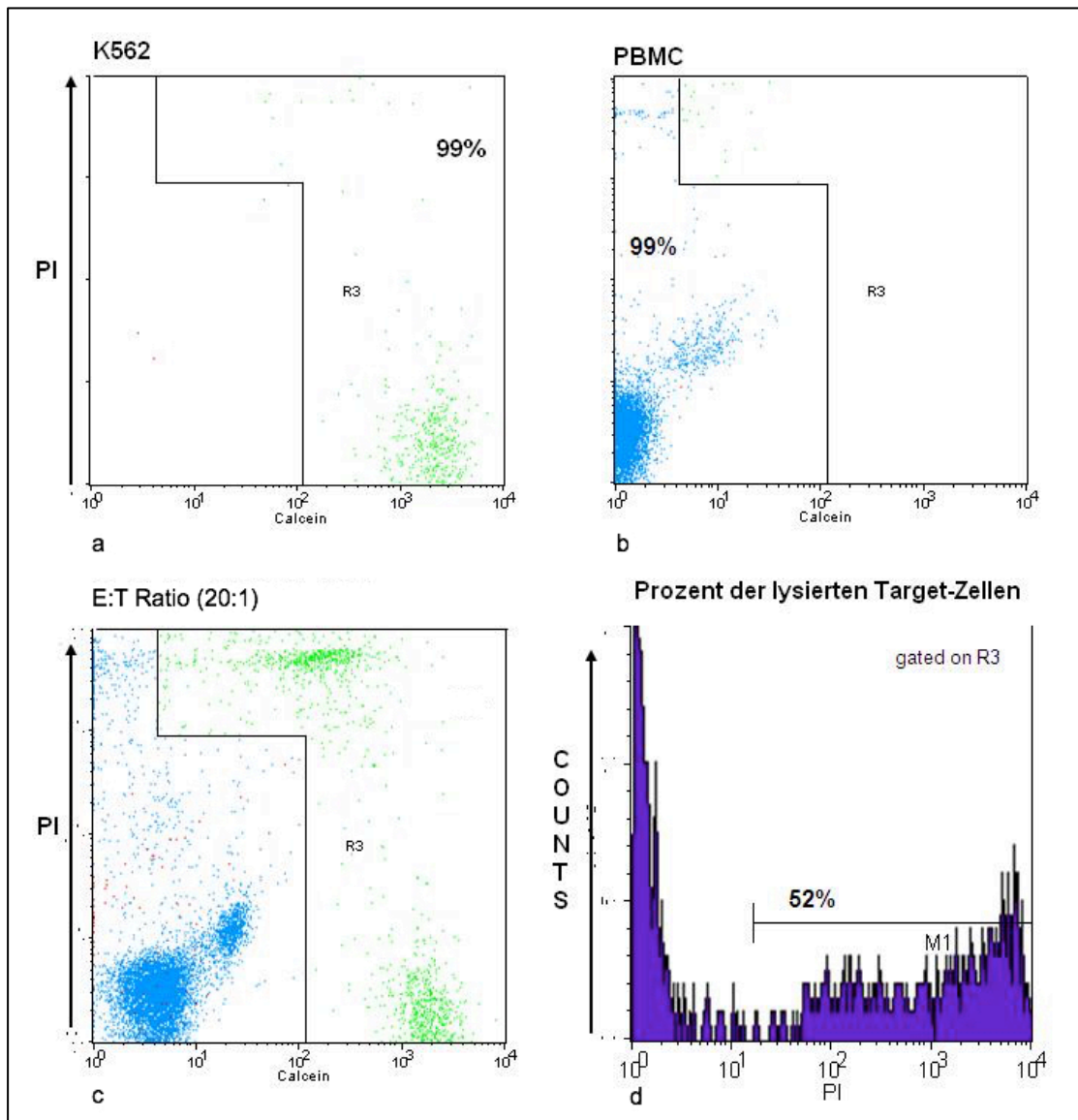


Abbildung 3: Auswertung Lyse Assay mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der verwendeten Gating Strategie, **a:** Target-Zellen (K562), **b:** PBMC, **c:** Kombination aus PBMC (blau) und K562 (grün), mit bereits lysiertem Calcein-positiven Target-Zellen (R3 stark PI positiv); **d:** lysierter Prozentanteil der Targetzellen in R3, die Calcein und PI positiv sind

Abbildung 4 zeigt die Gating Strategie bei einem Ko-Kultur Experiment mit 3 verschiedenen Zelltypen (PBMC, K562 oder AML-Blasten, diverse Stromazellen). Mit Hilfe von CD45, ubiquitär vorhanden auf allen hämatopoetischen Zellen, konnte zwischen MSC (hier MS-5), Effektor- und Targetzellen unterschieden werden.

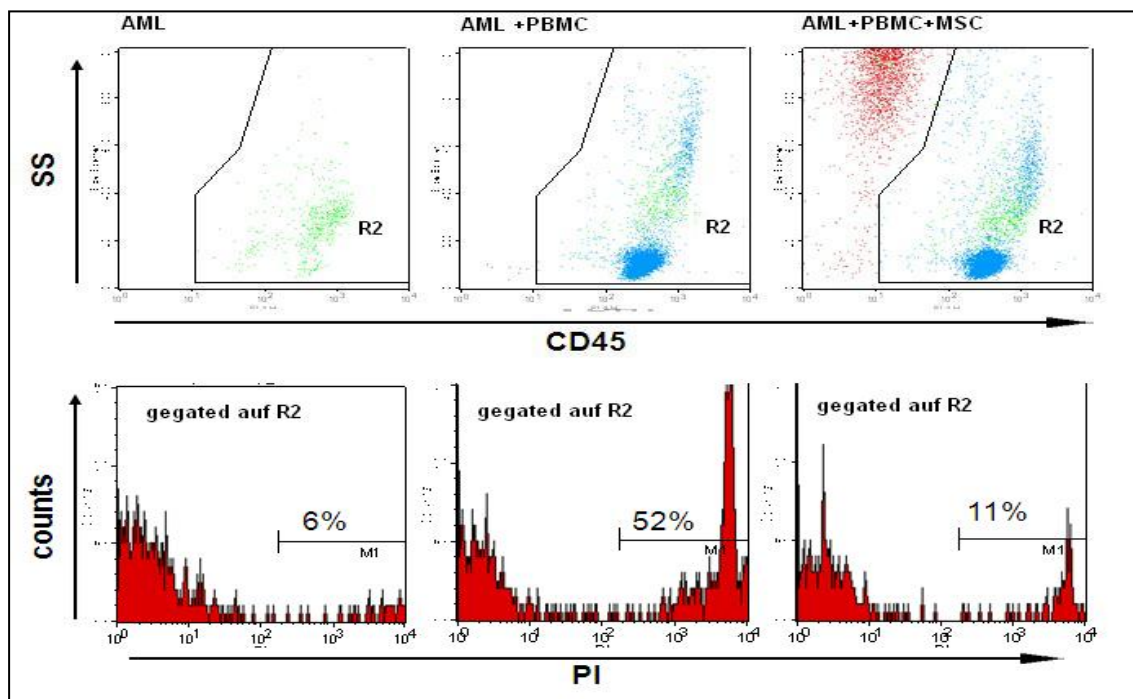


Abbildung 4: Ko-Kultur mit Gating Strategie (oben). Auswertung der PI positiven Zellen in R2 (unten). Oben links: CD45 positive AML-Blasten (in Region 2 [R2]). Oben Mitte: CD45 positive AML-Blasten mit PBMC. Oben rechts zeigt CD45 positive AML-Blasten und PBMC in R2, mit CD45 negativen Stromazellen (hier MS-5 in Rot) die außerhalb R2 liegen und somit nicht in die Messung, siehe Abbildung 3, einfließen. Die Abbildungen unten zeigen die PI positiven (lysierten Targetzellen) in R2 nach der Messstrategie aus Abbildung 3.

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden jeweils drei Experimente, sofern nicht anders angegeben, durchgeführt. Es erfolgte die Bestimmung des Mittelwerts sowie der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau (p-Wert) wurde mit Hilfe des t-Tests bestimmt. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde von einem signifikanten und bei einem p-Wert von $\leq 0,01$ von einem hochsignifikanten Ergebnis ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Hypoxie auf NK- und T-Zellen

Zuerst wurde untersucht, wie sich die im Knochenmarks-Microenvironment physiologisch vorherrschende Hypoxie auf die Expression von 12 unterschiedlichen Oberflächenmarkern auf normale Lymphozyten gesunder Spender (siehe **Tabelle 4** für Charakteristika) aus dem peripheren Blut auswirkt.

Spender PBMC	Alter	Geschlecht	% NK-Zellen
1	25	m	17
2	35	m	18
3	40	w	7
4	26	w	13
5	40	m	14

Tabelle 4: PBMC Spendercharakteristik mit Anteil der NK-Zellen (%)

Nach 48 Stunden Inkubation unter 1% O₂ zeigte sich, dass die Viabilität (%) der Zellen nicht wesentlich durch den reduzierten Sauerstoffgehalt beeinflusst wurde (21% O₂: Mittelwert: 30,7 ± 18,7% PI+ Zellen (tot); 1% O₂: Mittelwert 31,7 ± 9,8% PI+ Zellen (tot), p = 0,94).

Zur Überprüfung der möglichen Auswirkung der Hypoxie auf NK- und T-Zellen wurden 12 unterschiedliche Oberflächenmarker einmalig gemessen (**Tabelle 5**).

	NK-Zellen		T-Zellen	
CD Marker	21% O ₂	1% O ₂	21% O ₂	1% O ₂
CD38 %	97	96	63	59
CD28 %	0	0	98	98
CD58 %	97	96	38	37
CD71 %	0	0	1	3
CD11b %	98	94	12	12
CD154 %	0	0	0	0
CD16 %	79	68	0	0
CD25 %	0	0	12	10
CD27 %	0	2	85	91
CD69 %	13	56	16	17
CD40 %	0	0	2	2
CD274 %	90	98	84	93

Tabelle 5: Expression der Oberflächenmarker (%) auf PBMC unter 21% und 1%

O₂ nach einer Inkubation von 48 Stunden

Dabei zeigte sich, dass es zu einem fünffachen Anstieg von CD69 auf NK-Zellen unter Hypoxie kam. Der Anstieg (%) von CD69 unter Hypoxie (1% O₂) nach 48-stündiger Inkubation beschränkte sich nur auf NK-Zellen (21% O₂: Mittelwert: 13,7 ± 3,2%; 1% O₂: Mittelwert: 63,0 ± 9,8%, p < 0,05), während bei T-Zellen kein Unterschied beobachtet wurde (21% O₂: Mittelwert: 3,6 ± 0,15%; 1% O₂: Mittelwert: 14,2 ± 4,6%, p = 0,16). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5** zusammengefasst.

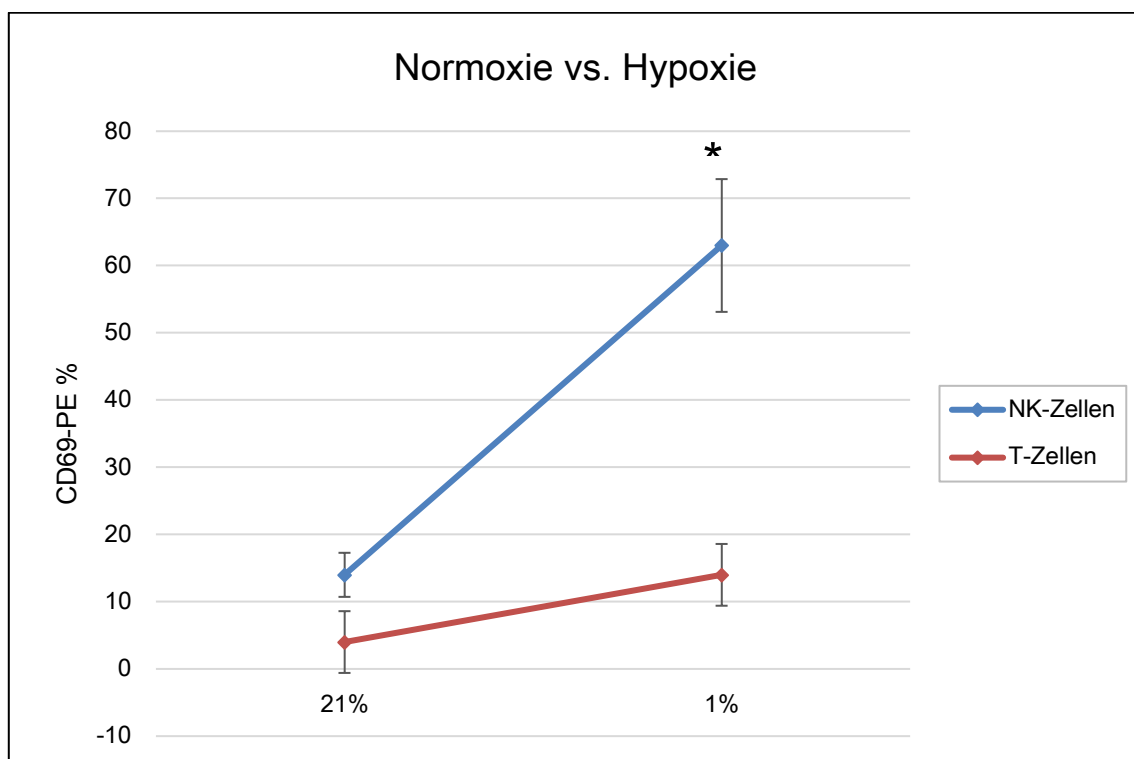


Abbildung 5: Anstieg von CD69 auf NK-Zellen unter Hypoxie im Vergleich zu CD69 auf T-Zellen nach 48-stündiger Inkubation

3.2 Hypoxie-konditionierte PBMC und deren Effekt auf die Lyse von Zelllinien

Um zu untersuchen, welche Subpopulation von Lymphozyten für die zellvermittelte Lyse verantwortlich ist, wurden NK- und T-Zellen mittels MACS separiert und aufgereinigt. In einem ersten Ansatz wurden sofort nach Gewinnung der separierten NK und T-Zellen gesunder Spender ein Lyse-Ansatz mit der Zelllinie K562 durchgeführt. Nach vierstündiger Inkubation in Normoxie zeigte sich, dass ausschließlich NK-Zellen für die zellvermittelte Lyse verantwortlich sind (durchschnittliche Lyse (%) mit - NK-Zellen: Mittelwert: $43,8 \pm 4,1\%$; T-Zellen: Mittelwert: $10,4 \pm 0,7\%$, $p < 0,05$; siehe **Abbildung 6**).

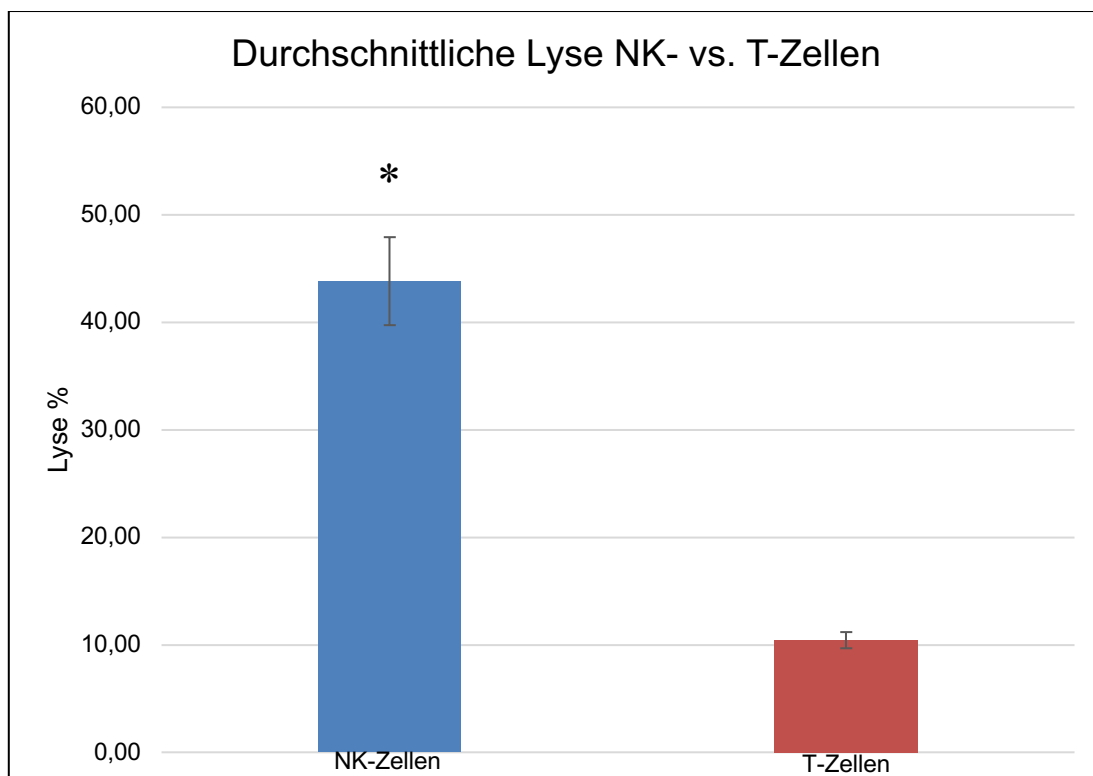


Abbildung 6: Ausschließlich NK Zellen vermitteln eine Lyse von K562 Zellen in Normoxie.

In Hypoxie aktivierte NK-Zellen, die zuvor 48 Stunden unter 1% O₂ inkubiert wurden, exprimierten vermehrt CD69 und dies führte zu einer im Mittel 1,4-fachen Zunahme der Lyse der K562 Zelllinie (Mittelwert Lyse (%) unter 21% O₂: 53,3 ± 8,8%; Mittelwert Lyse (%) unter 1% O₂: 74,3 ± 6,7%, p < 0,05; **Abbildung 7).**

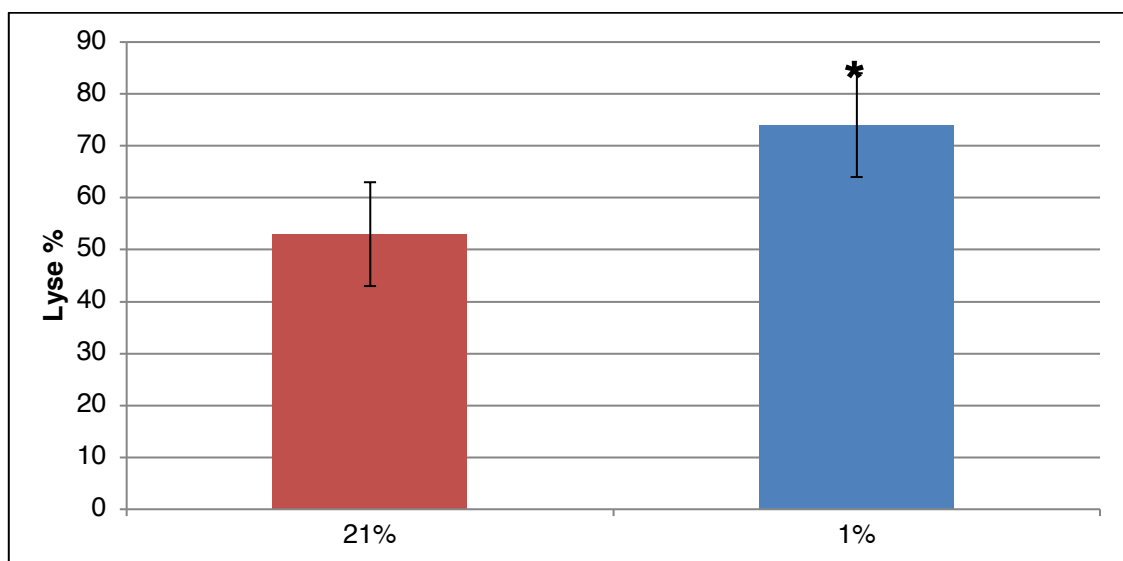


Abbildung 7: Vergleich Lyse K-562 durch in Normoxie versus Hypoxie inkubierten PBMC (1% O₂ vs. 21% O₂)

3.3 Hypoxie-konditionierte PBMC und deren Effekt auf die Lyse von primären AML-Blasten

Nachdem in diesen Modelversuchen gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen durch hypoxische Konditionierung aktiviert werden und die zelluläre Lyse damit erhöht werden kann, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob ähnliche Ergebnisse auch bei primären AML-Blasten erzielt werden können. Daher wurden primäre AML-Blasten für alle weiteren Lyse-Experimente verwendet (n = 5, Patientencharakterisierung siehe **Tabelle 6**).

AML	Alter	Geschlecht	FAB	Genetik	Blastenanteil (%)
1	82	w	M1	NPM1 A Mutation, FLT3 ITD	92
2	54	w	M1	FLT3 ITD	91
3	52	w	M4eo	Inversion 16	60
4	62	w	NA	NA	65
5	24	m	M4	Trisomie 8	80

Tabelle 6: Patientencharakteristika der primären AML-Blasten

Im ersten durchgeführten Experiment mit primären Zellen, kam es jedoch zu keiner Zunahme der Lyse durch die hypoxisch konditionierten NK-Zellen (E:T 40:1: 32,9% Lyse (unter 21% O₂) versus 26,1% Lyse (unter 1% O₂), E:T 80:1: 54,4% Lyse (unter 21% O₂) versus 47,7% Lyse (unter 1% O₂)).

Deshalb wurden als nächstes PBMC 48 Stunden mit IL-2 (100U/ml) unter Normoxie (21% O₂) stimuliert. IL-2 bewirkte hier eine ausgeprägte Stimulation der NK-Zellen mit dem Ziel eine vermehrte Lyse der primären Blasten zu erreichen. Gezeigt werden konnte in einem Kontrollexperiment mit der Zelllinie K562, dass es zu einer Zunahme der Lyse kommt (E:T Ratio 40:1: 14,1% Lyse versus 39,6%, E:T Ratio 80:1: 27,5% versus 49,1%, **Abbildung 8**). Interessanterweise zeigte sich bei primären AML-Blasten, trotz der vorangehenden Stimulation der NK-Zellen durch IL-2, keine Zunahme der Lyse (Mittelwerte: E:T 20:1: 24,6 ± 15,9% versus 30,3 ± 9,7% mit IL-2, p = 0,4; E:T 40:1: 41,3 ± 10,1% versus 42,6 ± 9,5% mit IL-2, p = 0,06; **Abbildung 8**).

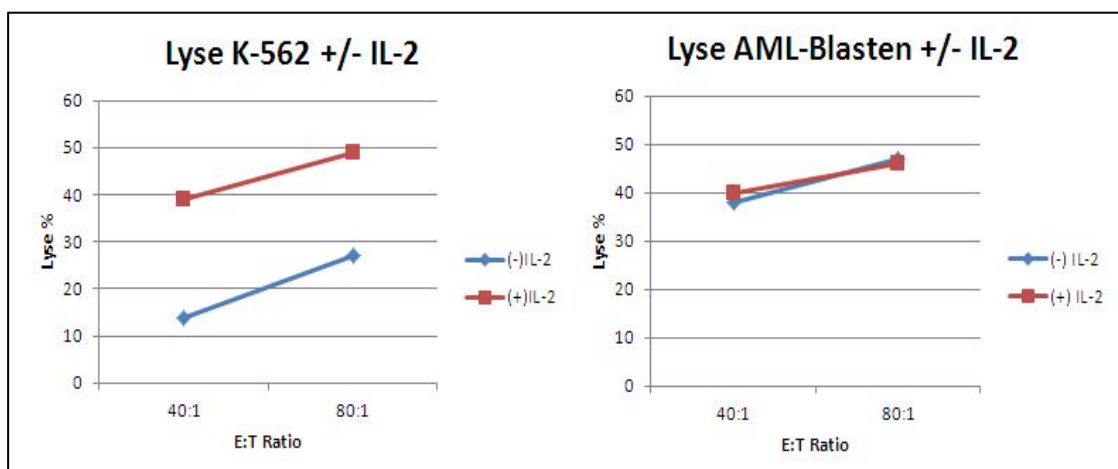


Abbildung 8: Links: Lyse K-562 mit und ohne IL-2 Stimulation. Rechts: Lyse primäre AML-Blasten mit und ohne IL-2 Stimulation

3.4 Mesenchymale Stromazellen schützen AML-Blasten vor NK-Zell-vermittelter Lyse

Um einen möglichen protektiven Effekt mesenchymaler Stromazellen auf die NK-Zell-vermittelte Lyse von AML-Blasten zu untersuchen, wurden Experimente mit primären AML-Blasten durchgeführt (n=5, Klassifikation in **Tabelle 6**). Die Viabilität der AML-Blasten wurde nicht wesentlich von der Ko-Kultur mit der Stromazelllinie MS-5 (25×10^3 pro Kultur) nach einer Inkubation in 21% O₂ von 48 Stunden beeinflusst (Viabilität der primären AML-Blasten nach 48 Stunden Inkubation 90,0% ohne MSC versus 90,6% mit MSC, nicht signifikant).

Für die Ko-Kultur Experimente wurden unstimulierte, frisch gewonnene PBMC, primäre AML-Blasten sowie die Stromazelllinie MS-5 verwendet. Nach einer vierstündigen Inkubation in Normoxie zeigte sich, dass MSC in der Lage waren, der NK-Zell-vermittelten Lyse der AML-Blasten entgegenzuwirken (Mittelwerte: E:T Ratio 20:1 Lyse $74,6 \pm 4,8\%$ versus $36,6 \pm 7,8\%$ Lyse mit MSC, $p < 0,05$; E:T Ratio 10:1 Lyse $59,6 \pm 3,2\%$ versus $29,3 \pm 6,7\%$ Lyse mit MSC, $p < 0,05$; siehe **Abbildung 9**).

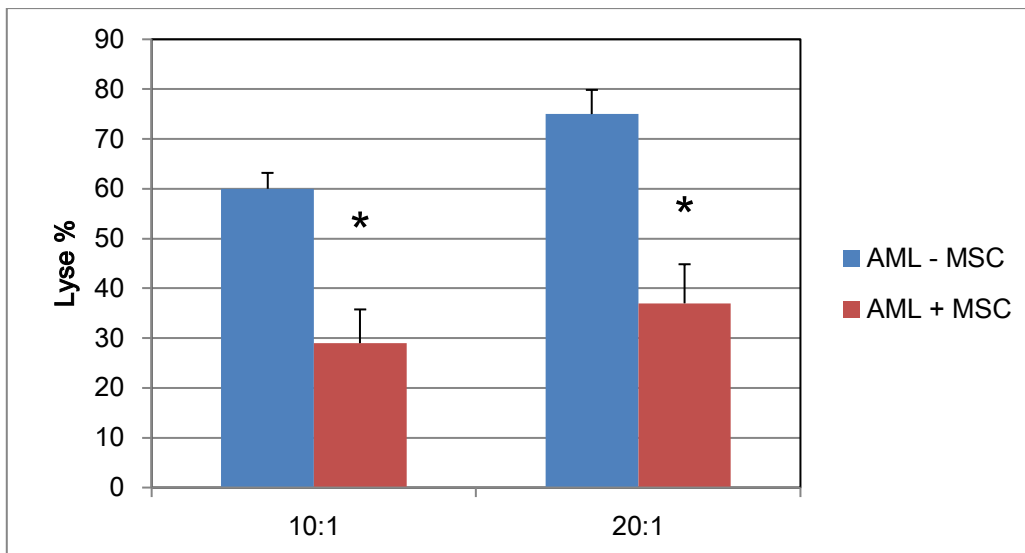


Abbildung 9: NK-Zell-vermittelte Lyse von primären AML-Blasten mit (+) und ohne (-) MSC (MS-5) mit den E:T Ratios 10:1 und 20:1

3.5 Mechanismus der MSC-vermittelten Protektion von AML-Blasten

Um den Mechanismus des protektiven Effekts von MSC auf AML-Blasten weiter eingrenzen zu können, wurden zwei unterschiedliche Stromazelllinien verwendet: Während die Linie „EL08-1D2“ für hämatopoetische Zellen supportive Eigenschaften besitzt und aktiv in die Ausreifung hämatopoetischer Stammzellen eingreift (sog. *supporter*), besitzt die ansonsten gleiche Linie „EL28-1B3“ diese Eigenschaften nicht (und wird daher als *non-supporter* bezeichnet).

Die Ko-Kultur Experimente erfolgten zusätzlich zu diesen beiden Zelllinien erneut mit primären AML-Blasten und unstimulierten, frisch gewonnenen nicht separierten Lymphozyten unter Standardlaborbedingungen (21% O₂). Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die unterstützende Linie EL08-1D2 primäre AML-Blasten vor der NK-Zell-vermittelten Lyse schützte (Mittelwerte: Lyse (%) ohne MSC: 57,7 ± 5,0%; Lyse (%) mit EL28-1D3: 61,7 ± 8,4%; Lyse (%) mit EL08-1D3: 34,0 ± 3,5%, $p < 0,05$; siehe **Abbildung 10**).

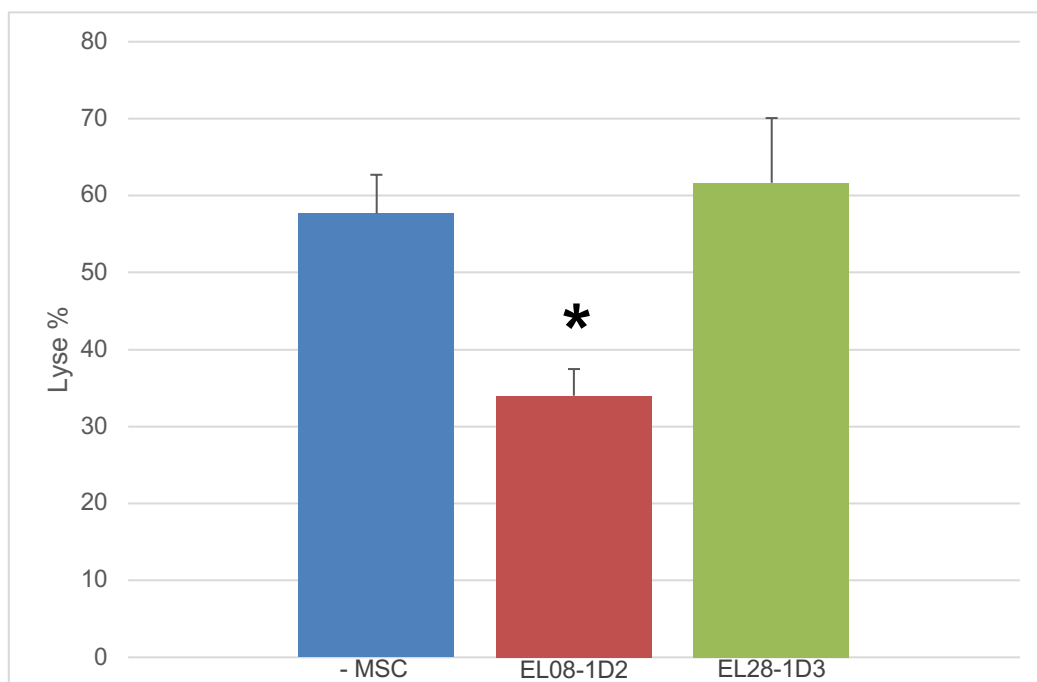


Abbildung 10: NK-Zell-vermittelte Lyse von primären AML-Blasten ohne MSC (links), mit der Stromazelllinie EL08-1D2 (Mitte) und der Stromazelllinie EL28-1D3

4. Diskussion

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung, bei der es trotz intensiver Chemotherapie häufig zu Rezidiven kommt. Bei AML, die aufgrund ihres genetischen Risikoprofils ein besonders hohes Rezidivrisiko aufweisen, stellt die allogene Stammzelltransplantation die einzige kurative Option dar, wobei der Graft-versus-Leukämie-Effekt die entscheidende Rolle spielt. Es handelt sich hierbei also um eine erfolgreiche Immuntherapie der AML.

Daher wurde schon seit längerem versucht, weitere immuntherapeutische Behandlungskonzepte zu etablieren. Trotz vielversprechender *in vitro* Ergebnisse zeigte sich, dass in klinischen Studien viele dieser Ansätze weit weniger erfolgreich waren als gedacht. Mögliche Gründe dafür könnten einerseits das fehlende Verständnis der komplexen immunologischen Prozesse *in vivo* oder das fehlende Wissen über die passenden Zielantigene der AML-Blasten sein. Auch das im Knochenmark vorherrschende Microenvironment mit seinen löslichen und zellulären Bestandteilen könnte immunologische Prozesse *in vivo* beeinflussen. Einen wesentlichen Bestandteil des Mikroenvironments stellt die physiologisch vorherrschende Hypoxie im Knochenmark dar. Diese nimmt sowohl Einfluss auf Stammzellen als auch auf Immunzellen.

So konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen, die 48 Stunden physiologisch hypoxischen Bedingungen (1% O₂) ausgesetzt waren, aktiviert wurden und vermehrt CD69 exprimierten. Bei CD69 handelt es sich um ein ko-

stimulatorisches Molekül, das wichtig für die Proliferation und Sekretion von Zytokinen ist und zu einer vermehrten Zytotoxizität von NK-Zellen führt [94]. Die hypoxische Aktivierung beschränkte sich jedoch nur auf NK-Zellen. T-Zellen wurden nicht beeinflusst und die CD69-Expression blieb unverändert. Interessanterweise hatte eine 48-stündige hypoxische Exposition keinerlei Einfluss auf die Viabilität von NK- und T-Zellen, primären AML-Blasten und anderen Zelllinien. In den darauffolgenden Lyse-Experimenten zeigte sich, dass die hypoxische Aktivierung zu einer signifikant gesteigerten Zunahme der Lyse der Zelllinie K-562 durch NK-Zellen führte. Für primäre AML-Blasten konnte jedoch eine vermehrte Lyse durch aktivierte NK-Zellen nicht nachgewiesen werden. Selbst die Exposition dieser NK-Zellen mit IL-2, welches diese bekanntermaßen stimuliert [95], führte hier zu keiner Zunahme einer zellvermittelten Lyse primärer Blasten.

Bekannt ist bereits, dass NK-Zellen durch hypoxische Bedingungen beeinflusst werden. Im Rahmen solider Tumore mit intratumoraler Hypoxie konnte gezeigt werden, dass über die Sekretion sowie über das hypoxische Tumor-Microenvironment NK-Zellen gehemmt werden und ihre zytotoxische Aktivität abnimmt [91, 96]. Zu tumorfreier hypoxischer Inkubation gibt es widersprüchliche Angaben. So fand man heraus, dass NK-Zellen, die 96 Stunden unter Hypoxie inkubiert wurden, die Möglichkeit verlieren, aktivierende Rezeptoren - auf die Zytokine wirken (z.B. IL-2) - auszubilden. Dies geht mit einer verminderten Tumorzell-Lyse einher. Interessanterweise wird die Antikörper-vermittelte Lyse von Zellen dabei nicht beeinflusst [90]. Andererseits

konnte eine andere Arbeit zeigen, dass Hypoxie auch zur vermehrten Expression von aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen führen kann [97].

Den hier präsentierten Daten zufolge scheint Hypoxie nur Einfluss auf die Expression von CD69 auf NK-Zellen nehmen. Die vermehrte Expression erhöht deren Aktivität ausschließlich gegenüber der Zelllinie K-562. Vermutlich spielt die Dauer der Inkubation sowie das Ausmaß der Hypoxie eine Rolle, um eine vermehrte Lyse und Expression von CD69 herbeizuführen. Ebenso könnte die Inkubation in Hypoxie der magnetisch separierten NK-Zellen alleine oder in „unseparierter“ Form als PBMC Einfluss auf deren Aktivierung haben. Womöglich beeinflussen T-Zellen die Expression von CD69 auf NK-Zellen. Letztendlich konnte der Mechanismus der hypoxischen Aktivierung von NK-Zellen und der Expression von CD69 in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Denkbar wäre jedoch, dass Hypoxie eine Art „Stress-Signal-Weg“ in NK-Zellen aktiviert und somit deren Aktivität steigert.

Zur zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen ist bekannt, dass sie sowohl die Zelllinie K562 als auch diverse AML-Zelllinien lysieren können [98]. Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass aktive NK-Zellen bei Patienten mit AML für ein längeres rezidivfreies Überleben sorgen [99]. Deshalb werden die zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen mittlerweile als Immuntherapie zur Behandlung einer AML genutzt. Zugelassen ist dabei die Stimulation von NK-Zellen mit IL-2 in Kombination mit Histamin-Dihydrochlorid. Dabei kommt es

durch die stimulierten NK-Zellen zur vermehrten Lyse der AML-Blasten. Histamin-Dihydrochlorid verhindert dabei die Hemmung der stimulierten NK-Zellen durch Monozyten sowie Granulozyten [69]. Inhibierend wirken dabei Sauerstoffradikale, produziert von Monozyten, die zur Apoptose von NK-Zellen führen und somit eine Immunsuppression bewirken [100]. Auch in dieser Arbeit konnte erneut belegt werden, dass NK-Zellen für die Lyse von Zelllinien, aber auch von primären AML-Blasten verantwortlich sind. Die ausbleibende Zunahme der Lyse von primären Blasten durch hypoxie-aktivierte NK-Zellen könnte einerseits am speziellen und eventuell protektiven, bislang noch unbekannten, Microenvironment der AML-Blasten selbst liegen. Andererseits könnten Monozyten oder Granulozyten mit den NK-Zellen, wie weiter oben beschrieben, interferieren.

Für eine Interferenz spricht, dass nicht einmal eine vorausgehende Stimulation mit IL-2, trotz Zunahme von CD69 auf NK-Zellen und Zunahme der Lyse der Zelllinie K-562, zu einer vermehrten Lyse von primären AML-Blasten führte. Eine Hypothese wäre, dass die NK-Zellen während der vierstündigen Inkubation mit den AML-Blasten durch noch einen zu identifizierenden Mechanismus (z. B. Zytokine) inhibiert werden. Denkbar wären auch methodische Fehler, z. B. dass zur Stimulation der NK-Zellen zu wenig IL-2 verwendet wurde, und / oder die Dauer der Inkubation nicht ausreichend war, um eine vermehrte Lyse von AML-Blasten herbeizuführen.

Zusätzlich wäre auch, wie bereits weiter oben beschrieben, eine Hemmung der NK-Zellen durch Monozyten sowie Granulozyten plausibel. So scheint auch hier eine alleinige Stimulation mit IL-2 nicht ausreichend zu sein und zusätzliche Faktoren, wie Histamin-Dihydrochlorid [69], werden für die *in vitro* Lyse von primären Blasten benötigt. Aber auch das Fehlen bestimmter ko-stimulatorischer Signale oder die exklusive Stimulation der NK-Zellen durch IL-2 vor den Lyse-Experimenten, könnten eine Erklärung für die unveränderte Lyse sein. Womöglich wäre eine dauerhafte Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 oder eine dauerhaft vorherrschende Hypoxie notwendig, um eine vermehrte Lyse von primären Blasten herbeiführen zu können. Dies zeigt ein weiteres Mal, wie der lösliche Anteil des Microenvironments Einfluss auf immunologische Prozesse nimmt. Dabei spielt nicht nur das lösliche Microenvironment, sondern auch das zelluläre Mikroenvironment eine zentrale Rolle.

So stellen die mesenchymalen Stromazellen einen weiteren relevanten Faktor des Microenvironment im Knochenmark neben der Hypoxie dar. Diese nehmen einerseits regulatorischen Einfluss auf Stammzellen und AML-Blasten und bilden andererseits die sogenannte Stammzellnische aus [77, 78]. Bei den MSC handelt es sich um pluripotente Stromazellen, die sich in eine Vielzahl von Zellen differenzieren können. MSC führen zudem zu einer vermehrten Produktion von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie in AML-Blasten. Dies bewirkt eine verminderte Apoptose, die durch Chemotherapeutika induziert wird [84].

Um zu überprüfen, ob MSC ebenfalls Einfluss auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen nehmen, wurde in dieser Arbeit eine Ko-Kultur mit der murinen Stromazelllinie MS-5, den NK-Zellen und primären AML-Blasten durchgeführt. Hier kam es zu einem signifikanten Rückgang der Lyse primärer AML-Blasten durch NK-Zellen. Diese verminderte Lyse der AML-Blasten in Ko-Kultur mit MSC lässt sich mit Hilfe zweier Hypothesen erklären (**Abbildung 11**).

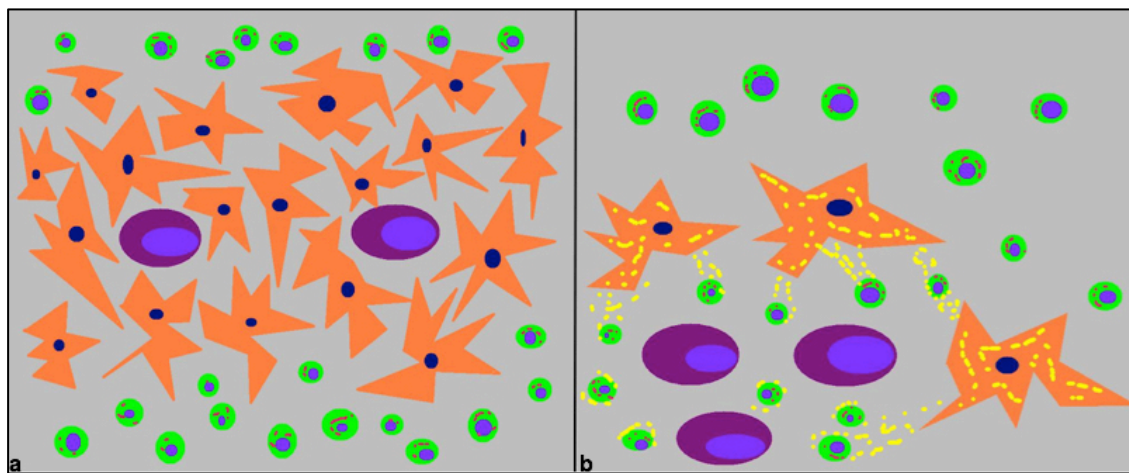


Abbildung 11a: Barrierefunktion der MSC (orange) um AML-Blasten (violett). NK-Zellen (grün). **11b:** verminderte Toxizität der NK-Zellen durch diverse Mediatoren (gelb)

Die erste Hypothese wäre, dass MSC eine Art Schutzbarriere um AML-Blasten bilden und somit zu einer verminderten Lyse führen (**Abbildung 11a**). Somit hätten es die NK-Zellen einerseits mit einer vermehrten Zellzahl (MSC und AML-Blasten) zu tun, was wiederum zu einer Änderung der E:T Ratio führt. Dadurch könnte die Anzahl der Effektorzellen zu niedrig sein, um genügend

AML-Blasten lysieren zu können. Alternativ könnte ein Zellverband aus MSC auch dazu führen, dass die Blasten durch diese maskiert würden und ein notwendiger Zell-Zellkontakt von AML-Blasten und NK-Zellen damit erschwert oder gar unmöglich gemacht wird. Somit könnten die NK-Zellen ihre zytotoxische Aktivität über den Granzym-Perforin-Mechanismus nicht ausreichend entfalten.

Die zweite Hypothese besagt schließlich, dass MSC mit Hilfe von Mediatoren die NK-Zell-Funktion direkt beeinflussen (**Abbildung 11b**). Untermauert wird diese Hypothese dadurch, dass MSC immunmodulatorische und immunsupprimierende Effekte auf NK-Zellen ausüben.

Um den Mechanismus dieser Protektion genauer verstehen zu können, wurden in einem nächsten Schritt zwei verschiedene Stromazelllinien verwendet. Zum einen kam die Stromazelllinie EL08-1D2, die mit Hilfe verschiedener Mediatoren (Wachstumsfaktoren) die Ausreifung sowie das Überleben von AML-Blasten ex-vivo sichert (Support), zum Einsatz [92, 93]. Zum anderen wurde die Stromazelllinie EL28-1D3, ohne supportive Eigenschaften, verwendet [92, 93]. Es zeigte sich schließlich, dass ausschließlich Ko-Kultur-Experimente mit der supportiven Stromazelllinie zu einer reduzierten Lyse der AML-Blasten durch NK-Zellen führte. Somit erscheint eine alleinige Barrierefunktion durch MSC unwahrscheinlich. Deshalb müssen MSC immunmodulatorische Eigenschaften besitzen und damit Einfluss auf die NK-Zell-Funktion nehmen.

So ist bereits bekannt, dass MSC mit Hilfe verschiedener Mediatoren (z.B. Tumornekrosefaktor, Prostaglandin E2 u.v.m.) sowie Zell-Zell-Kontakt Einfluss auf die Proliferation, Zytokin-Sekretion, Regulation und Zytotoxizität von T-Zellen nehmen. Auch B-Zellen und deren Produktion von Antikörpern und ko-stimulatorischen Molekülen werden durch MSC reguliert [101].

Mittlerweile sind mehr als ein Dutzend Faktoren bekannt, die direkt eine immunmodulierende oder immunsupprimierende Wirkung auf verschiedene Effektorzellen ausüben. Diese immunmodulatorischen Eigenschaften wurden auch bereits klinisch erprobt. So konnten MSC erfolgreich bei akuten sowie chronischen GvH-D eingesetzt werden, welche auf die herkömmlichen Therapien nicht mehr ansprachen. Die MSC inhibierten die alloreaktiven T-Zellen. Der Einsatz der MSC erwies sich als sicher und kaum immunogen [102, 103].

So erscheint es folglich logisch, dass auch NK-Zellen durch MSC beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass IL-2 aktivierte NK-Zellen durch MSC in deren zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion gehemmt werden. Verantwortlich dafür ist eine verminderte Expression von aktivierenden NK-Zellrezeptoren. Mögliche Mediatoren der MSC für die Immunmodulation scheinen Indolamin 2,3-Dioxygenase und Prostaglandin E2 zu sein [104, 105]. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass MSC, die vermehrt den TLR4 (Toll-like-receptor) exprimierten, weniger IL-8 und IL-6 sezernierten. Dies führte zu einem Rückgang der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen. Zur vermehrten

Expression von TLR4 auf MSC kam es, wenn diese in Ko-Kultur mit AML-Blasten waren. Blockierte man den TLR4 auf MSC, kam es wieder zu einer Regeneration der NK-Zell-Funktion mit Zunahme der Zytotoxizität und Proliferation [106]. Interessanterweise zeigten sich die inhibitorischen Effekte nur, wenn die NK-Zellen mehrere Tage mit den MSC inkubiert wurden. Bei frisch isolierten NK-Zellen, ohne mehrtägige Inkubation mit MSC, kam es zu keiner Abnahme der Lyse trotz Ko-Kultur [107].

Folglich scheinen supportive MSC eine zentrale Rolle in der Immunmodulation von Abwehrzellen zu spielen. Sie nehmen direkt Einfluss auf die zellvermittelte Lyse von NK-Zellen, selbst in einer nur vierstündigen Ko-Kultur mit den NK-Zellen. Somit könnten sich Blasten in Ko-Kultur selbst mit einem protektiven Microenvironment umgeben, das immunsupprimierend wirkt. MSC schützen Blasten womöglich vor NK-Zell-vermittelter Lyse mit Hilfe ihrer Wachstumsfaktoren, analog zur Chemotherapeutika-Resistenz über eine verminderte Apoptose [84]. Dafür spricht, dass NK-Zellen mit Hilfe von Granzymen die Apoptose einleiten.

Zukünftig wäre es wünschenswert, die molekularen Mechanismen hinter der immunsupprimierenden Wirkung durch MSC weiter zu erforschen. Vor allem die rasche Inhibition der NK-Zellen durch MSC in Ko-Kultur bedarf einer genaueren Betrachtung. Auch der Einfluss auf AML-Blasten und deren Resistenz gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse erfordert weitere Untersuchungen. Zusätzlich sollten Experimente mit verschiedenen MSC-Zelllinien und primären

MSC durchgeführt werden, um mögliche weitere Unterschiede im Support/Non-Support identifizieren zu können. Auch der Einfluss verschiedener AML-Zelllinien sowie primärer AML-Blasten auf MSC benötigt weitere Erforschungen.

Ziel sollte es sein, die immunmodulatorischen Zusammenhänge zu verstehen, um neue Therapien entwickeln zu können. Des Weiteren sollte es zukünftig möglich sein, *in vitro* ein Microenvironment simulieren zu können, mit dessen Hilfe das Verhalten von Chemotherapeutika oder Immunzellen möglichst realitätsnah abgebildet werden kann, um deren *in vivo* Funktionalität besser vorhersagen zu können.

5. Zusammenfassung

Die AML ist eine maligne Erkrankung der Hämatopoese, bei der es durch ungehemmte Proliferation unreifer klonaler myeloischer Progenitoren (sog. leukämische Blasten) zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese kommt. Trotz intensiver Chemotherapie führt die Erkrankung häufig zum Tode. Haupttodesursache sind Rezidive, also das Wiederauftreten leukämischer Blasten nach initial erfolgreicher Chemotherapie mit Erreichen einer kompletten Remission. Im Falle eines Rezidivs kann eine Heilung nur noch durch eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) erreicht werden. Hierbei spielt zwar die rein zytotoxische Wirkung der Konditionierungstherapie eine Rolle, wesentlich ist aber auch der immunologische Effekt: bei der allogenen Stammzelltransplantation werden neben den Stammzellen auch Immunzellen (überwiegend T-Zellen) übertragen, was zur Ausbildung des sog. Graft-versus-Leukemia-Effekts im Empfänger führt. Die allogene SZT stellt damit die erfolgreichste Immuntherapie der AML dar. Andere immuntherapeutische Ansätze haben bislang die in sie gesetzten Erwartungen nicht vollständig erfüllt. Ein möglicher Grund könnte das *in vivo* Microenvironment sein, welches bei der Entwicklung solcher Therapieansätze nur unzureichend berücksichtigt wurde. In diesem Projekt wurde der Fokus auf die physiologischerweise im Knochenmark vorherrschende Hypoxie mit einem pO_2 von 1% sowie auf mesenchymalen Stromazellen (MSC) gelegt, da eigene und andere Vorarbeiten Auswirkungen dieser Komponenten auf die AML belegt haben.

Es konnte gezeigt werden, dass von 12 untersuchten Oberflächenmarkern nur CD69 bei NK-Zellen unter einem pO_2 von 1% vermehrt exprimiert wird (63% vs. 13%, $p < 0,05$). Da diese hypoxisch konditionierten NK-Zellen auch vermehrt AML- und CML-Zelllinien lysierten (74% vs 53%, $p < 0,05$), kann eine spezifischen Aktivierung durch Hypoxie vermutet werden. Hingegen fanden sich in T-Zellen durch Hypoxie keine signifikanten Änderungen in den untersuchten Parametern. Während sich die Ergebnisse in AML-Zelllinien bestätigen ließen, gelang dies nicht in primären AML-Proben von Patienten, auch nicht nach Stimulation mit IL-2.

In einem nächsten Schritt wurde die Rolle von MSC auf die NK-Zell-vermittelte Lyse untersucht. Im Ko-Kultur-Modell, bestehend aus Target- (AML) und Effektorzellen (NK- und T-Zellen), wurden signifikant weniger lysierte AML-Blasten beobachtet als im Modell ohne MSC (50% Reduktion, $p < 0,05$). Darauf aufbauend wurden 2 verschiedene MSC-Linien verwendet: EL08-1D2, welche MSC durch Sekretion von Wachstumsfaktoren unterstützt und EL28-1D3, die keine solche Fähigkeit aufweist. Der Effekt der Protektion von AML-Blasten wurde nur bei der MSC-Linie EL08-1D2 beobachtet (34% Lyse vs. 61% Lyse, $p < 0,05$). Dies bedeutet, dass eine aktive Sekretion von Mediatoren durch MSC relevant ist und nicht die rein physische Präsenz von MSC.

Zusammenfassend implizieren diese Daten eine Rolle des Microenvironment in der Immunantwort von NK-Zellen gegenüber AML. Dies legt nahe, dass Faktoren wie der Sauerstoffpartialdruck und MSC zukünftig bei der *in vitro* Untersuchung nicht nur von Chemotherapeutika, sondern auch von Immuneffekten berücksichtigt werden sollten.

6. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor Michael Fiegl für seine Geduld, gute Betreuung und Kritik.

Für die gute Betreuung bedanke ich mich auch bei Frau Michaela Wagner, ohne die viele Experimente und Auswertungen nicht möglich gewesen wären.

Zu guter Letzt gilt mein Dank auch meinen Eltern sowie meiner Familie, Freunden und meiner Lebensgefährtin.

7. Kongressbeiträge

- 04.2013 Symposium der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Herrsching
- 10.2014 Posterpräsentation DGHO Kongress, Wien

8. Veröffentlichungen

Vasold J, Wagner M, Drolle H, Deniffel C, Kütt A, Oostendorp R, Sironi S, Rieger C, Fiegl M.

The bone marrow microenvironment is a critical player in the NK cell response against acute myeloid leukaemia in vitro.

Leuk Res. 2015 Feb;39(2):257-62. doi: 10.1016/j.leukres.2014.12.001. Epub 2014 Dec 9. PubMed PMID: 25542695.

Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kütt A, Deniffel C, Sotlar K, Sironi S, Herold T, Rieger C, Fiegl M.

Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy.

Leuk Res. 2015 Jul;39(7):779-85. doi: 10.1016/j.leukres.2015.04.019. Epub 2015 May 7. PubMed PMID: 25982178.

9. Eidesstattliche Versicherung

Jochen Vasold

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Das Microenvironment der Akuten Myeloischen Leukämie und dessen
Beeinflussung der Immunantwort von Natürlichen Killer Zellen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.07.2019

Jochen Vasold

Ort, Datum

Unterschrift

10. Literaturverzeichnis

1. Hiddemann, W., et al., *Management of acute myeloid leukemia in elderly patients*. J Clin Oncol, 1999. **17**(11): p. 3569-76.
2. Juliusson, G., et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4179-87.
3. Blum, W. and P. Porcu, *Therapeutic apheresis in hyperleukocytosis and hyperviscosity syndrome*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(4): p. 350-4.
4. Weinberg, O.K., et al., *Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1906-8.
5. Heaney, M.L. and G. Soriano, *Acute myeloid leukemia following a myeloproliferative neoplasm: clinical characteristics, genetic features and effects of therapy*. Curr Hematol Malig Rep, 2013. **8**(2): p. 116-22.
6. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
7. Haferlach, T., et al., *Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach*. Ann Hematol, 2007. **86**(5): p. 311-27.
8. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
9. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
10. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.

11. Mayer, R.J., et al., *Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B.* N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 896-903.
12. Buchner, T., et al., *Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group.* J Clin Oncol, 1985. **3**(12): p. 1583-9.
13. Buchner, T., et al., *Improved cure rate by very early intensification combined with prolonged maintenance chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia: data from the AML Cooperative Group.* Semin Hematol, 1991. **28**(3 Suppl 4): p. 76-9.
14. Sekeres, M.A., et al., *Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients.* Blood, 2009. **113**(1): p. 28-36.
15. Schmid, C., et al., *Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation.* Blood, 2006. **108**(3): p. 1092-9.
16. Socie, G., et al., *Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies.* Blood, 2001. **98**(13): p. 3569-74.
17. Koreth, J., et al., *Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials.* JAMA, 2009. **301**(22): p. 2349-61.
18. Finke, J., et al., *Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2009. **10**(9): p. 855-64.
19. Hamad, N., et al., *Mycophenolate-based graft versus host disease prophylaxis is not inferior to methotrexate in myeloablative-related donor stem cell transplantation.* Am J Hematol, 2015. **90**(5): p. 392-9.
20. Wolff, D., et al., *Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-*

- Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(5): p. 767-76.
21. Schmidt-Hieber, M., et al., *Efficacy of the interleukin-2 receptor antagonist basiliximab in steroid-refractory acute graft-versus-host disease.* Br J Haematol, 2005. **130**(4): p. 568-74.
 22. Ball, L.M., et al., *Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease.* Br J Haematol, 2013. **163**(4): p. 501-9.
 23. Greinix, H.T., et al., *Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease.* Transfus Apher Sci, 2014. **50**(3): p. 349-57.
 24. Kuci, Z., et al., *Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey.* Haematologica, 2016. **101**(8): p. 985-94.
 25. Teshima, T., *JAK inhibitors: a home run for GVHD patients?* Blood, 2014. **123**(24): p. 3691-3.
 26. Akpek, G., et al., *Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease.* Blood, 2001. **97**(5): p. 1219-26.
 27. Lee, S.J., G. Vogelsang, and M.E. Flowers, *Chronic graft-versus-host disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(4): p. 215-33.
 28. Kuzmina, Z., et al., *Significant differences in B-cell subpopulations characterize patients with chronic graft-versus-host disease-associated dysgammaglobulinemia.* Blood, 2011. **117**(7): p. 2265-74.
 29. Detrait, M.Y., et al., *Pre-transplantation risk factors to develop sclerotic chronic GvHD after allogeneic HSCT: a multicenter retrospective study from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC).* Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(2): p. 253-8.
 30. Wolff, D., et al., *Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD.* Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(12): p. 1611-28.
 31. Wolff D, G.A., Ayuk F et al, *Klinische Praxis der chronischen GVHD - ein Expertenkonsens aus Deutschland, Österreich und der Schweiz.* Deutsches Ärzteblatt, 2011. **108**: p. 732-740.

32. Sperr, W.R., et al., *A novel effective and safe consolidation for patients over 60 years with acute myeloid leukemia: intermediate dose cytarabine (2 x 1 g/m² on days 1, 3, and 5)*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 3965-71.
33. Prebet, T., et al., *Acute myeloid leukemia with translocation (8;21) or inversion (16) in elderly patients treated with conventional chemotherapy: a collaborative study of the French CBF-AML intergroup*. J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4747-53.
34. Grimwade, D. and K. Mrozek, *Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am, 2011. **25**(6): p. 1135-61, vii.
35. Lowenberg, B., et al., *Cytarabine dose for acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1027-36.
36. Buchner, T., et al., *6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4496-504.
37. Holmskov, U., S. Thiel, and J.C. Jensenius, *Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 547-78.
38. Hiemstra, P.S., *The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung*. Exp Lung Res, 2007. **33**(10): p. 537-42.
39. Sjoberg, A.P., L.A. Trouw, and A.M. Blom, *Complement activation and inhibition: a delicate balance*. Trends Immunol, 2009. **30**(2): p. 83-90.
40. Jan C. Behrends, J.B., Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings, Stephan Grissmer, Markus Hoth, Armin Kurzt, Jens Leipziger, Frank Müller, Claudia Pedain, Jens Rettig, Cahrlotte Wagner, Erhard Wischmeyer, *Duale Reihe Physiologie*. 2010: Thieme.
41. Gellert, M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 101-32.

42. Miller, J.F., *The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes*. Immunol Rev, 2002. **185**: p. 7-14.
43. Nguyen, H.H., et al., *Heterosubtypic immunity to influenza A virus infection requires a properly diversified antibody repertoire*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 9331-8.
44. von Boehmer, H., et al., *The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen*. Immunol Rev, 1989. **109**: p. 143-51.
45. Nitta, T., et al., *Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation*. Adv Immunol, 2008. **99**: p. 59-94.
46. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus*. Nature, 1994. **372**(6501): p. 100-3.
47. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-40.
48. Thomas, M.J., et al., *T cytotoxic 1 and T cytotoxic 2 CD8 T cells both inhibit IgE responses*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**(1-3): p. 187-9.
49. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2076-82.
50. Unutmaz, D., *RORC2: the master of human Th17 cell programming*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1452-5.
51. Chatila, T.A., *Role of regulatory T cells in human diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 949-59; quiz 960.
52. Broere, F., S. G. Apasov, et al., *T cell subsets and T cell-mediated immunity*. Springer Basel AG, 2011.
53. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
54. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
55. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
56. Smyth, M.J., et al., *Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6658-62.

57. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 850-61.
58. Heusel, J.W., et al., *Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells*. Cell, 1994. **76**(6): p. 977-87.
59. Trapani, J.A., et al., *Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4127-33.
60. Motyka, B., et al., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 491-500.
61. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
62. Bradley, M., et al., *Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4248-55.
63. Screpanti, V., et al., *A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2068-73.
64. Chen, W., et al., *Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon*. Eur J Immunol, 2004. **34**(1): p. 194-9.
65. Ferris, R.L., *Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(29): p. 3293-304.
66. Galluzzi, L., et al., *Classification of current anticancer immunotherapies*. Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.
67. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
68. Bracci, L., et al., *Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 15-25.
69. Brune, M. and K. Hellstrand, *Remission maintenance therapy with histamine and interleukin-2 in acute myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 1996. **92**(3): p. 620-6.

70. Blaise, D., et al., *The use of a sequential high dose recombinant interleukin 2 regimen after autologous bone marrow transplantation does not improve the disease free survival of patients with acute leukemia transplanted in first complete remission.* Leuk Lymphoma, 1997. **25**(5-6): p. 469-78.
71. Brune, M., et al., *Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial.* Blood, 2006. **108**(1): p. 88-96.
72. Baer, M.R., et al., *Low-dose interleukin-2 immunotherapy does not improve outcome of patients age 60 years and older with acute myeloid leukemia in first complete remission: Cancer and Leukemia Group B Study 9720.* J Clin Oncol, 2008. **26**(30): p. 4934-9.
73. Martner, A., et al., *Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia.* Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1041701.
74. Barrett, A.J., *Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction.* Stem Cells, 1997. **15**(4): p. 248-58.
75. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes.* Blood, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
76. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone.* J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
77. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.* Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
78. Nilsson, S.K., H.M. Johnston, and J.A. Coverdale, *Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches.* Blood, 2001. **97**(8): p. 2293-9.
79. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells.* Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
80. Manabe, A., et al., *Adhesion-dependent survival of normal and leukemic human B lymphoblasts on bone marrow stromal cells.* Blood, 1994. **83**(3): p. 758-66.

81. Manabe, A., et al., *Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1992. **79**(9): p. 2370-7.
82. Samudio, I., et al., *The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5198-205.
83. Samudio, I., et al., *Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 142-56.
84. Konopleva, M., et al., *Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1713-24.
85. Fiegl, M., et al., *CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1504-12.
86. Fiegl, M., et al., *Physiological hypoxia promotes lipid raft and PI3K-dependent activation of MAPK 42/44 in leukemia cells*. Leukemia, 2010. **24**(7): p. 1364-7.
87. Drolle, H., et al., *Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy*. Leuk Res, 2015. **39**(7): p. 779-85.
88. Kuett, A., et al., *IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18411.
89. Sitkovsky, M.V., et al., *Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 5947-52.
90. Balsamo, M., et al., *Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC*. Eur J Immunol, 2013. **43**(10): p. 2756-64.
91. Berchem, G., et al., *Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF-beta and miR23a transfer*. Oncoimmunology, 2016. **5**(4): p. e1062968.
92. Oostendorp, R.A., et al., *Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1183-9.

93. Oostendorp, R.A., et al., *Long-term maintenance of hematopoietic stem cells does not require contact with embryo-derived stromal cells in cocultures*. Stem Cells, 2005. **23**(6): p. 842-51.
94. Borrego, F., et al., *CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor*. Immunology, 1999. **97**(1): p. 159-65.
95. Yu, T.K., et al., *IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6244-51.
96. Hasmim, M., et al., *Critical Role of Tumor Microenvironment in Shaping NK Cell Functions: Implication of Hypoxic Stress*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 482.
97. Seon Ah Lim, Y.M., Hyunsung Park and Kyung-Mi Lee, *NK cell effector functions are differentially regulated by hypoxic conditions (TUM9P.1014)*. The Journal of Immunology, 2015. **194**(1 Supplement 210.16).
98. Zarcone, D., et al., *Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Cancer Res, 1987. **47**(10): p. 2674-82.
99. Lowdell, M.W. and M.B. Koh, *Immunotherapy of AML: future directions*. J Clin Pathol, 2000. **53**(1): p. 49-54.
100. Thoren, F.B., A.I. Romero, and K. Hellstrand, *Oxygen radicals induce poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in cytotoxic lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7301-7.
101. Gao, F., et al., *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2062.
102. Ringden, O. and K. Le Blanc, *Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 65-72.
103. Ringden, O., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease*. Transplantation, 2006. **81**(10): p. 1390-7.
104. Spaggiari, G.M., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1327-33.

105. Spaggiari, G.M., et al., *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.* Blood, 2006. **107**(4): p. 1484-90.
106. Lu, Y., et al., *TLR4 plays a crucial role in MSC-induced inhibition of NK cell function.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. **464**(2): p. 541-7.
107. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells.* Eur J Immunol, 2006. **36**(10): p. 2566-73.